



Sveučilište u Zagrebu

Filozofski fakultet

Odsjek za etnologiju i kulturnu antropologiju

Studij antropologije

DIPLOMSKI RAD
STANDARDNE I EKSPERIMENTALNE METODE
ODREĐIVANJA DOŽIVLJENE STAROSTI
JOSIPA ANTOLOVIĆ

Mentorica: dr. sc. Zdravka Hincak, izv. prof.

Zagreb, rujan 2018.

SADRŽAJ

1. UVOD	4
2. BIOLOŠKA I KRONOLOŠKA DOB.....	5
3. STANDARDNE/MAKROMORFOLOŠKE METODE	6
3.1. Određivanje fetalne/prenatalne starosti	6
3.2. Određivanje starosti u prenatalnoj fazi.....	9
3.3. Određivanje starosti od postnatalne dobi do adolescencije	15
3.4. Određivanje starosti u odrasloj dobi	34
4. EKSPERIMENTALNE METODE	49
4.1. Histološke metode odredbe doživljene starosti na koštanom materijalu.....	49
4.2. Racemizacija aminokiselina (AAR)	51
4.3. Multifaktorske metode određivanja starosti	52
4.4. Određivanje starosti pomoću DNA analize – metilacija DNA.....	54
4.4.1. Analiza svježih uzoraka.....	55
4.4.2. Ograničenja metode analize metilacije DNA	58
4.4.3. Budućnost određivanja starosti ljudskih ostataka pomoću metilacije DNA.....	61
5. RASPRAVA.....	63
6. ZAKLJUČAK	69
7. LITERATURA.....	71

SAŽETAK

U ovom ćemo se diplomskome radu osvrnuti na standardne i eksperimentalne metode određivanja doživljene starosti. Najprije je ustanovljena razlika između biološke i kronološke dobi. Zatim je napravljen pregled radova koji se bave problematikom starenja i određivanja starosti pojedinca, u arheološkom i modernom kontekstu. Standardne metode podijeljene su prema starosnim skupinama - od fetalne do odrasle dob - s obzirom da se promjene na skeletnim i dentalnim ostacima razlikuju ovisno o vremenu, odnosno razdoblju života i anatomskoj poziciji na kojoj su vidljive. Nakon standardnih, opisane su i eksperimentalne metode koje se mogu koristiti neovisno o razdoblju života, a dijele se na mikroskopske/histomorfometrijske, racemizaciju aminokiselina, multifaktorsku metodu te metilaciju DNA. Svaka od opisanih metoda popraćena je i istraživanjima koja su dovela (i danas dovode) do napretka u području forenzičke antropologije i određivanja doživljene starosti.

Ključne riječi: standardne metode, eksperimentalne metode, doživljena starost

ABSTRACT

In this master's thesis, we will do a review of the standard and experimental methods of determining the age at death. First, we will differentiate between biological and chronological age. Furthermore, an overview of papers related to ageing and age at death determination of an individual in an archaeological and modern context has been made. Standard methods are divided into age groups (from fetal to adult period), as changes in skeletal and dental remains differ depending on the time or age group and the anatomical position in which they are visible. Therewith, experimental methods that can be used independently of the age group are described and divided into microscopic/histomorphometric, amino acid racemization, multifactor method and DNA methylation. Each of the methods described has been accompanied by research that has led to (and still contribute to) advancement in the field of forensic anthropology and the determination of age at death.

Key words: determination of age at death, standard methods, experimental methods

1. UVOD

Ustanoviti doživljenu starost jedan je od glavnih zadataka stručnjaka iz područja forenzike, sudske medicine, bioarheologije i forenzičke antropologije (uz određivanje spola i patologija). Doživljena starost ili dob u trenutku smrti važan je podatak u slučajevima identifikacije, sudskim procesima te određivanju demografije arheoloških, ali i modernih populacija. U forenzičnoj antropologiji analiziraju se skeletni ostaci te se utvrđuje veza između biološke dobi i histoloških promjena na skeletnim i dentalnim ostacima, a biološka je dob povezana sa mnogostrukim biološkim procesima, posebice rastom, formacijom i razgradnjom koštanog tkiva (Ortner, 2003). Metode korištene za određivanje starosti dijele se na standardne/makromorfološke i eksperimentalne metode. Standardne metode koriste stručnjaci kojima morfološki mogu identificirati i objasniti promjene na skeletnim ostacima uzrokovane starenjem. Odnose se na određivanje skeletne dobi od fetalnog doba do adolescencije, a starost se određuje analizom pojave osifikacijskih centara (centara okoštavanja), morfologije i veličine osifikacijskih centara te sraštanja primarnih i sekundarnih osifikacijskih centara. Kod odraslih pojedinaca, svi su osifikacijski centri srasli te je potrebno primjenjivati pokazatelje koji se pojavljuju u odrasloj dobi, a nisu povezani s razvojem, već degenerativnim promjenama u tijelu. Tako se analizira stupanj propadanja plohe na stidnoj kosti (*facies symphysialis os pubis*), uškaste površin ecrijevne kosti (*sulcus auricularis*), završetaka rebara za uzglobljavanje sa prsnom kosti (*facies sternalis os costae*), sraštanje šavova lubanje (*suturae cranii*) te drugi indikatori kao što je glava ramene kosti (*caput humeri*) ili osteoporozne promjene na kralježnici. Važno je napomenuti da se kod mlađih pojedinaca razvoj može različito odvijati (npr. ovisno o socioekonomskom statusu) na što se mora obratiti pozornost kod određivanja biološke dobi. Kod odraslih jedinki, vremena pojave degenerativnih promjena nužno se ne podudaraju u arheološkim i modernim populacijama, a ovise i o patološkim promjenama. Doživljena se starost može odrediti razvojem denticije, odnosno analizom dentalnih ostataka. Dentalni su ostaci učestao i pouzdan uzorak, upravo zbog dobre očuvanosti. Eksperimentalne metode se odnose na mikroskopske/histomorfometrijske metode, racemizaciju aminokiselina, multifaktorsku metodu te metilaciju DNA. Ove su metode, neke zbog visokedestruktivnosti, a neke zbog nedovoljne količine DNA, rjeđe korištene u analizi arheoloških populacija, ali stvaraju dobru

podlogu za daljnja istraživanja. Sve metode navedene u radu ispitivane su na uzorcima poznate dobi kako bi se sa sigurnošću mogla utvrditi pouzdanost samih metoda.

2. BIOLOŠKA I KRONOLOŠKA DOB

Koncept biološke dobi povezan je sa vremenom, a koristi se kao indikator napretka razvojnog kontinuuma pojedinca (Scheuer, Black, 2000:6). Analizom skeletnih ostataka utvrđuje se biološka ili koštana dob pojedinca. Važno je utvrditi razliku između biološke i kronološke dobi - biološko se starenje odnosi na akumulaciju generativnih i degenerativnih procesa, posljedičnu promjenu veličine, stanja i funkcionalnosti tkiva te starenje fizioloških, kemijskih, osjetilnih i psiholoških funkcija organizma (Ascádi, Nemeskéri, 1970:102). S druge strane, kronološka starost predstavlja tek zbroj godina pojedinca od njegova rođenja, a procjena kronološke starosti iz koštane starosti temelji se na mjerama rasta i razvoja za mlađe osobe, a kod odraslih pojedinaca na indikatorima biološke starosti (stupanj propadanja) (Klepinger, 2006:42). Kronološka i biološka dob preklapaju se u određenoj mjeri samo u ranijim godinama, dok se u odrasloj dobi njihova korelacija smanjuje, što otežava procjenu starosti u poodmaklim godinama. Dio stručnjaka smatra da je procjena više i visoke starosti (50 i više godina) gotovo nemoguća, odnosno da su odstupanja kod rezultata, a time i nepreciznost metoda, toliko velika da je svaki pokušaj sužavanja intervala dobi, osim širokih 50+ ili 60+ kategorija, uzaludan (Berg, 2008:569).

S obzirom na da su ispitivanja napredovala te se poboljšala preciznost odredbe starosti, proširio se i raspon podjela razdoblja života.

Prema makromorfološkim karakteristikama koštanih ostataka i denticije, danas je najprihvaćenija podjela starosnih skupina prema Martinu (1957)¹:

- infans I (stadij mliječne denticije, do 7 godina)
- infans II (od izbijanja prvog trajnog zuba do izbijanja trajnog M₂, od 7 do 14 godina)
- juvenilis (od izbijanja M₂ do sraštanja *synchondrosis spheno-occipitalis* u *os basilare*, od 14 do 21 godine)

¹ Uz Martina, najprihvaćenije podjele razdoblja života dali su Acsádi i Nemeskéri (1970) te Ferembach i suradnici (1980).

- adultus I (od 21 do 29 godina)
- adultus II (od 30 do 39 godina)
- maturus I (od 40 do 49 godina)
- maturus II (od 50 do 59 godina)
- senilis (> od 60 godina) (Martin i sur., 1957)

Zahvaljujući novijim metodama određivanja starosti, ovoj podjeli je pridodana još jedna dob – *perinatus-fetus* – uključuje fetalnu dob koja obuhvaća starost fetusa od šest ili devet tjedana (dva do tri mjeseca), kada se pojavljuju prvi osifikacijski centri nekih kostiju do poroda (Scheuer, Black, 2000:468).

3. STANDARDNE/MAKROMORFOLOŠKE METODE

U prvim ćemo se poglavljima osvrnuti na standardne, makromorfološke metode određivanja starosti u trenutku smrti. Pregled metoda obuhvatit će faze od fetalne dobi do odrasle, a u svakoj ćemo se fazi osvrnuti na opis metoda te uključiti relevantna istraživanja vezana uz njih.

3.1. Određivanje fetalne/prenatalne starosti

O određivanju fetalne starosti još uvijek se vode mnogobrojne rasprave. U toj je fazi nemoguće sa sigurnošću odrediti točan datum oplodnje, a podaci opstetričara i embriologa također nisu u potpunosti kompatibilni (O'Rahilly, 1997). Kad je u pitanju klinički kontekst, jedini poznati datum je najčešće prvi dan posljednje menstruacije, ali čak i na preciznost tog datuma mogu utjecati faktori kao što je posfertilizacijsko krvarenje, nedosljednost u majčinu prisjećanju ili namjerno lažiranje starosti (Scheuer, Black, 2000). Osim što je nepoznat datum oplodnje, također se ne može odrediti ni datum inseminacije, osim u iznimnim slučajevima kao što su silovanje ili *in vitro* oplodnja. Kada bi se i znali navedeni datumi, vremenski raspon između inseminacije i fertilizacije je varijabilan, što dodatno otežava procjenu starosti.

Scheuer i Black (2000) još navode kako razvojni embriolozi starost računaju od trenutka fertilizacije (otprilike dva tjedna nakon prvog dana posljednje menstruacije) te da prenatalna dob traje otprilike 266 dana (9,5 lunarnih mjeseci)². Ponovno se pojavljuje problem varijacije u intervalu od ovulacije do fertilizacije, zbog čega je teško procijeniti točnu dob embrija (Tucker, O'Rahilly, 1972). Prema Tuckeru i O'Rahillyju (1972) nije dovoljno samo poredati individualne embrije u niz koji pretpostavlja poredak razvoja, s obzirom da se morfološki razvoj ne podudara nužno sa pretpostavljenom starošću; neki se pojedinci razvijaju brže. Osim toga, veličina fetusa također nije najprecizniji indikator razvoja, s obzirom da veći embriji nisu nužno razvijeniji od manjih, što je slučaj i u postnatalnoj dobi (Tucker, O'Rahilly, 1972:520). U povijesnom kontekstu, starost je izražavana u terminima dužina (tjeme-trtica³, tjeme-peta⁴, stopala⁵) (Streeter, 1920). Smatralo se da je najbolji način za procjenu starosti embrija grupiranje u skupine, ali prema njihovom sazrijevanju. Takav je sistem najprije razvio Streeter, podijelivši 8 postovulatornih tjedana u 23 faze koje je nazvao Carnegie faze⁶.

Tablica 1. prikazuje Carnegie faze, od kojih je svaka opisana brojem unutarnjih i vanjskih morfoloških kriterija neovisnih o veličini, ali indikativnih za sazrijevanje. Ovaj je postupak započeo Streeter (1942), a nastavili su O'Rahilly i suradnici (1972). U **Tablici 2.** vidljivo je da su do devetog tjedna razvoja faze izražene u vrijednostima dužine tjeme-trtica koja, iako nije najpreciznija mjera, pokazuje korelacije sa starošću. Croft i suradnici (1999) koristili su ultrazvuk kako bi odredili najprikladnije parametre za određivanje starosti koristeći ljudske fetuse fiksirane formalinom (abortirane i mrtvorodenčad) te su zaključili da su opseg glave i dužina stopala bolji indikatori dobi od CRL-a koji je nakon trećeg tromjesečja bio neprecizan zbog distorzije kralježnice uzrokovane kompresijom u ležištu (Scheuer, Black, 2000:6).

² Klinički se računa 280 dana (40 tjedana, odnosno 10 lunarnih mjeseci).

³ Crown-rump lenght (CRL)

⁴ Crown-heel lenght (CHL)

⁵ Foot lenght (FL)

⁶ Prvotni naziv bio je *Streeter developmental horizonos* (Streeter, 1920).

Table 1 Time-scale of embryonic period proper (8 postovulatory weeks)

Pairs of somites	Carnegie stage	Crown-rump length (mm)	Age (postovulatory)	
			Days	Weeks
1-3	6	–	15	3
	7	–	16	
	8	–	18	
	9	1.5–2.5	20	
4-12	10	2.0–3.5	22	4
13-20	11	2.5–4.5	24	
21-29	12	3.0–5.0	26	
30+	13	4.0–6.0	28	
	14	5.0–7.0	32	5
	15	7.0–9.0	33	
	16	8.0–11.0	37	6
	17	11.0–14.0	41	
	18	13.0–17.0	44	7
	19	16.0–18.0	47	
	20	18.0–22.0	50	8
	21	22.0–24.0	52	
	22	23.0–28.0	54	
	23	27.0–31.0	56	

Tablica 1. Prikaz 23 Carnegie faza, prema Scheuer i Black (2000:470).**Table 2** Time-scale of the prenatal period

Days	Weeks	Months	CRL (mm)	
1–28	1–4	1	See Table 1	} Embryo
29–56	5–8	2	See Table 1	
57–84	9–12	3	34–85	
85–112	13–16	4	86–140	} Fetus
113–140	17–20	5	141–190	
141–168	21–24	6	191–250	
169–196	25–28	7	251–290	
197–224	29–32	8	291–328	} Perinate
225–252	33–36	9	329–349	
253–280	37–40	10	350–360	

Tablica 2. Prikaz vremenskog raspona prenatalnog perioda i odnosa sa dužinom tjeme-trtica, prema Scheuer i Black (2000:470).

Dubowitz i suradnici (1970) procjenjivali su gestacijsku dob⁷ kod novorođenčadi promatrajući njegovu neurološku zrelost. Ovaj su sistem primijenili na uzorku 400 novorođenčadi različite gestacijske dobi. Nakon kliničke obrade, majkama su dani upitnici koji se tiču datuma posljednjeg dana menstruacije i redovnosti menstrualnih ciklusa. Samo 150 od 400 skupina podataka majki bile su pogodne za daljnju analizu, odnosno ispitivanje se nastavilo na uzorku 150 novorođene djece. Statistički je obrađena korelacija između gestacijske dobi i ukupnog rezultata neuroloških znakova, ukupni rezultat površnih znakova i sveukupni rezultati. Ovaj se sistem pokazao praktičnim, lako primjenjivim i brzim za provedbu.

U sljedećim ćemo se poglavljima osvrnuti na standardne metode procjene starosti u trenutku smrti na različitim anatomske dijelovima kao indikatorima doživljene starosti.

3.2. Određivanje starosti u prenatalnoj fazi

Starost pojedinca iz skeletnih ostataka ne može se odrediti iz svih koštanih elemenata (zbog njihovih različitih funkcija), već se stručnjaci orijentiraju na tri određene faze skeletnog razvoja - pojavljivanje osifikacijskih centara (centara okoštavanja), morfološku pojavu i, ako je moguće, vrijeme sraštavanja dvaju osifikacijskih centara na dijelovima skeleta iz kojih je moguće izvesti zaključke o starosti u trenutku smrti fetalnog perioda.

3.2.1. Pojava osifikacijskih centara

Osifikacijski centri formiraju se tijekom cijelog perioda skeletnog razvoja. U najranijim fazama se mogu identificirati gotovo isključivo prema anatomske pozicije, zato što ih je teško razlikovati prema morfologiji. Prisutnost mekog tkiva je neophodna kako bi identifikacija bila moguća, zbog toga što im ono služi kao fiksator anatomske pozicije. Većina se osifikacijskih centara formira u embriološkom i ranom fetalnom periodu, dok se većina sekundarnih centara formira postnatalno (Scheuer, Black, 2000). Važno je naglasiti da su podaci o fetalnom starenju dobiveni iz potpuno drugačijih izvora od onih dobivenih postnatalno te se koriste različite tehnike procjenjivanja doživljene starosti. U prenatalnom dobu istraživanja se uglavnom provode na abortiranim fetusima ili mrtvorodenčadi, zbog čega je procijenjena starost neprecizna ili su uzorci mogli imati određene anomalije. Brojni su

⁷ O odnosu različitih mjerenja i gestacijske dobi pisao je i Birkbeck (1976).

faktori koji utječu na fetalni razvoj, kao što su jednostruka ili višestruka okupiranost maternice, prehrana majke te prisutnost teratogena (nikotin, alkohol, droga), a takve su informacije najčešće nepoznate istraživačima (Roberts, 1976). Za razliku od prenatalnog razdoblja, istraživanja postnatalnog perioda provedena su na živoj djeci, posredstvom longitudinalnih ili radiografskih istraživanja, iako su pojedina promatranja izvedena na amputiranim i postmortalnim udovima, što može dovesti u pitanje preciznost procjene starosti (Scheuer, Black, 2000).

Prenatalni centri osifikacije uključuju centre na lubanji, kralježnici, rebrima, prsnoj kosti i primarne centre dugih kostiju udova, njihovih pojasa te članaka prstiju na šakama i stopalima. Neki primarni centri osifikacije nožnih zglobova i sekundarni centri koljena se pojavljuju posljednjih nekoliko tjedana prije poroda. Dva su faktora koji utječu na varijabilitet vremena pojave osifikacijskih centara: već spomenuta nemogućnost precizne procjene starosti u prenatalnoj dobi te tehnika korištenja.

Prije 1985. godine sva su istraživanja razvoja kosti kod tkiva embriološke i fetalne starosti te tkiva perinatalne novorođenčadi napravljena anatomsom disekcijom⁸ (Scheuer, Black, 2000) pa je tako do Kerckringa (1670) bilo tek nekoliko pokušaja prikazivanja kosti prije rođenja, a spomenuti autor je napravio opise primjeraka od drugog mjeseca fetalnog života⁹.

Nakon tih godina, korištene su tri osnovne metode – histološka analiza serijskih dijelova, čišćenje i bojanje alizarinom te radiološko ispitivanje, od kojih svaka ima različitu osjetljivost za detekciju kosti (Noback, Robertson, 1951:1).

O'Rahilly i Gardner (1972) smatraju da kost mora biti analizirana histološkim metodama, s obzirom da je i određena u histološkim terminima. Ova je tehnika ispitivanja serijskih dijelova komplicirana i oduzima puno vremena, ali većina klasičnih radova koji opisuju kostur ljudskog embrija napravljeni su upravo ovom metodom (Grube, Reinbach, 1976:7), ali gotovo uvijek rezultira procjenom ranije pojave osifikacijskih centara (Scheuer, Black, 2000).

Druga metoda uključuje čišćenje uzorka kalij-hidroksidom, nakon čega slijedi bojanje alizarinom u crveno. Ova je metoda pružala dobar uvid u osifikaciju cijelih embrija, a posebice u nastajanje periostalnog koštanog ovratnika i mineralizacije u zametku zuba (Zawisch, 1956). Nedostatak ove metode jest taj da uništava meko tkivo i može se upotrijebiti

⁸ Pregled u Noback (1943, 1944).

⁹ Crteži fetalnih kostura (Kerckring, 1717, Albinus, 1737, Rambaud i Renault, 1864) još uvijek su jedni od najboljih zapisa uzetih iz „golog“ uzorka.

samo u ranom periodu, dok su embrij ili fetus dovoljno maleni i prozirni (O'Rahilly, Gardner, 1972). Zbog toga što ova metoda nije ograničena na određenu kost i zato što se prvi znak pojave osteoida označava kao početak osifikacije, povećan je raspon vremena pojave centara¹⁰ (Scheuer, Black, 2000).

Treća metoda – radiološko ispitivanje fetusa – jednostavna je i brza te ostavlja uzorak netaknutim za daljnje ispitivanje različitim metodama. Detekcija kalcifikacije usporena je u odnosu na prethodne metode, dok se ne skupi dovoljna količina materijala kako bi tkivo bilo rendgenski vidljivo (Scheuer, Black, 2000.) Kalcificirana hrskavica i kost rendgenski su vidljivi te je prisutnost trabekula jedini radiografski pouzdani dokaz da je prisutna i kost (Roche, 1986). Ustanovljena je vremenska razlika između tehnike alizarinom i radiografskog snimanja koja ukazuje na pojavu kosti i iznosi otprilike jedan tjedan (Noback, 1944). Meyer i O'Rahilly (1958) koristili su sve tri spomenute metode na nekolicini uzoraka kako bi ispitali varijaciju u iskazanim vremenima, a dokazane razlike očito su uzrokovane korištenjem različitih tehnika, što je dovelo do daljnjih kontroverzi i rasprava o točnom vremenu pojave osifikacijskih centara u fetalnom dobu (Youseff, 1964., Wood i sur., 1969., O'Rahilly i Gardner, 1972.).

3.2.2. Morfologija i veličina osifikacijskih centara u prenatalnoj dobi

Tijekom razvoja, svaki osifikacijski centar pretpostavlja vlastitu jedinstvenu morfologiju, što nam omogućava identifikaciju u izolaciji i ne oslanja se na prisutnost mekog tkiva kako bi održao anatomske pozicije (Scheuer, Black, 2000). Jednom kada je kost identificirana, može se procijeniti njena starost ili iz veličine ili iz morfološke faze razvoja koje pokrivaju širok raspon starosti od srednjeg fetalnog života do odrasle dobi.

Primarni centri koji se pojavljuju u ranom dijelu prenatalnog života gotovo su svi prepoznatljivi kao zasebne kosti ili koštani elementi, a do srednjeg fetalnog (a posebno do rođenja), sve je moguće identificirati. Uključuju kosti lubanje (*cranium*), kralježnice (*vertebrae*), prsne kosti (*sternum*), rebra (*costae*), prsnog i zdjeličnog pojasa (*pelvis*) i dugih kostiju udova (*ossa longa*) (Scheuer, Black, 2000). Od trećeg mjeseca fetalnog života, uglavnom se gleda veličina – duge kosti su cjevaste, gotovo bez mišićnih hvatišta, a metopički i mandibularni šav nisu srasli. Do kraja fetalnog razdoblja, primarni centri individualnih kostiju su gotovo svi vidljivi.

¹⁰ Detaljan izvještaj cijelog kostura koristeći ovu metodu na 136 embrija dali su Noback i Robertson (1951).

Istraživanja fetalne osteologije provodili su Fazekás i Kósa (1978), a uključuju mjere dugih kostiju kostura (vidi **Tablice 3., 4. i 5.**) od trećeg lunarnog mjeseca fetalnog doba do poroda. Ova su mjerenja izvedene iz mađarskog uzorka fetalnih ostataka autopsije (kombinirani muški i ženski uzorci iz sredine 20.stoljeća) te su procjene starosti temeljene na fetalnoj dužini tjeme-peta (CHL). Njihov je materijal forenzičnog podrijetla i smatra se da dob nije procijenjena s velikom preciznošću (Scheuer, Black, 2000). Osim dugih kostiju, istraživali su i dijelove lubanje (*cranium*), zatiljnu kost (*os occipitale*), sljepoočnu kost (*os temporale*), tjemenu kost (*os parietale*), nosnu kost (*os nasale*), zatim prsnu kost (*sternum*), kralježnicu (*columna vertebralis*), ključnu kosti (*clavicula*) te lopaticu (*scapula*) (Fazekas, Kósa, 1978)¹¹.

Dry Bone Fetal Measurements-Humerus					
Prenatal Age (wks)	n	Max length (mm)		Distal width (mm)	
		Mean	Range	Mean	Range
12	2	8.8	8.5–9.0	1.9	1.9–2.0
14	3	12.4	11.6–14.0	2.2	2.0–2.5
16	9	19.5	18.0–20.5	4.7	3.2–6.0
18	15	25.8	23.0–28.5	6.1	5.5–7.0
20	13	31.8	29.7–35.0	7.8	7.0–9.0
22	11	34.5	32.5–36.9	8.3	7.6–9.0
24	12	37.6	35.0–43.0	9.3	8.4–10.5
26	12	39.9	37.0–45.0	9.9	9.4–10.8
28	12	44.2	40.5–47.0	10.9	9.7–12.0
30	12	45.8	42.0–50.0	11.9	11.0–13.3
32	8	50.4	47.0–53.0	12.5	12.0–13.2
34	7	53.1	51.0–57.1	13.6	13.0–14.0
36	5	55.5	53.6–60.0	14.4	14.0–15.0
38	7	61.3	55.0–62.5	15.7	15.0–17.5
40	10	64.9	61.6–70.0	16.8	15.0–19.0

Tablica 3. Podaci Fazekása i Kóse (1978) o povezanosti dužine ramene kosti (humerus) sa fetalnom starošću. Njihovim se istraživanjem pokazalo da su podaci kompatibilni sa radiografskim mjerenjima američkih fetusa (izvor: Warren, M.W. (1999). Radiographic determination of developmental age in fetuses and stillborns. *Journal of Forensic Sciences* 44(4): 708–712.)

¹¹ Detaljan pregled svih tablica mjerenja moguće je pronaći u Fazekas, Kósa (1978) te u Schefer, Scheuer, Black, (2009).

Dry Bone Fetal Measurements-Radius			
Prenatal Age (wks)	n	Max length (mm)	
		Mean	Range
12	2	6.7	5.5–8.0
14	3	10.1	9.1–11.5
16	9	17.2	15.3–20.5
18	15	21.5	20.0–23.5
20	13	26.2	25.0–29.2
22	11	28.9	26.7–33.0
24	12	31.6	29.0–35.0
26	12	33.4	31.7–38.5
28	12	35.6	33.0–37.1
30	12	38.1	35.5–40.6
32	8	40.8	37.0–43.2
34	7	43.3	41.0–44.6
36	5	45.7	44.0–49.5
38	7	48.8	45.7–51.0
40	10	51.8	47.5–58.0

Tablica 4. Podaci Fazekasa i Kóse (1978) o povezanosti dužine palčane kosti (*radius*) i starosti fetusa. Mjerenja su izvedena iz istog izvora kao i podaci o ramenoj kosti te se također podudaraju s podacima radiografskim mjerenja američkih fetusa (izvor: Warren, M.W. (1999). Radiographic determination of developmental age in fetuses and stillborns. Journal of Forensic Sciences 44(4): 708–712.).

Dry Bone Fetal Measurements-Ulna			
Prenatal Age (wks)	n	Max length (mm)	
		Mean	Range
12	2	7.2	5.5–9.0
14	3	11.2	10.2–12.5
16	9	19.0	16.2–22.0
18	15	23.9	21.0–26.6
20	13	29.4	27.0–33.1
22	11	31.6	29.6–33.6
24	12	35.1	31.5–39.0
26	12	37.1	35.0–40.5
28	12	40.2	38.0–43.5
30	12	42.8	40.0–46.6
32	8	46.7	41.2–49.2
34	7	49.1	46.5–51.0
36	5	51.0	49.0–55.4
38	7	55.9	52.7–58.0
40	10	59.3	55.0–66.5

Tablica 5. Podaci Fazekasa i Kóse (1978) o povezanost dužine lakatne kosti (*ulna*) sa fetalnom starošću (izvor: Warren, M.W. (1999). Radiographic determination of developmental age in fetuses and stillborns. *Journal of Forensic Sciences* 44(4): 708–712.)

Vidljiva je bliska korelacija između fetalne dobi i dužine kostiju, posebice kostiju donjih udova koji znatno pridonose visini. Postoje relativno velike baze podataka za usporedbu dužine dijafiza dugih kostiju i gestacijske dobi, a dijafize su mjerene direktno na fetusima obojenim alizarinom, na suhoj kosti ili pomoću standardne radiografije i ultrazvuka. Podaci o takvim mjerenjima dostupni su u Balthazard i Dervieux (1921), Hesdorffer i Scammon (1928), Scheuer i suradnici (1980). Bilo koji podatak dobiven mjerenjem abortiranih fetusa je transverzalan i može predstaviti abnormalne podatke. S vremenom se povećavao broj istraživanja ultrazvukom, ali podaci su dobiveni ili iz transverzalnih istraživanja ili iz longitudinalnih studija koje uključuju ograničeni broj promatranja po trudnoći (Bertino i sur., 1996).

3.2.3. Sraštanje osifikacijskih centara u prenatalnom dobu

Jedini dijelovi kostura koji sraštaju prije rođenja odnose se na one kosti koje okružuju mozak i leđnu moždinu, što odražava rani razvoj centralnog živčanog sustava (Humphrey, 1998), a ostatak koštanih elemenata srašta postnatalno.

3.2.4. Dentalna starost prenatalne dobi

Razvoj većine mliječne denticije započinje tijekom prenatalnog doba (14-16 tjedana nakon začeća) te se većina slučajeva analiziralo disekcijom, bojanjem alizarinom u crveno i radiografijom koristeći abortirane fetuse. Kao i kod sraštanja osifikacijskih centara, razvoj korijena mliječnih zuba i rane faze formiranja krune trajnih zuba odvija se postnatalno te će i o procjeni dentalne dobi postnatalnog razdoblja više riječi biti u narednim poglavljima.

3.3. Određivanje starosti od postnatalne dobi do adolescencije

Kao što je već navedeno, postnatalna dob računa se od dana rođenja. Pri istraživanjima, ispitanici često navode pogrešne datume rođenja ili ih namjerno lažiraju. Lovejoy i suradnici (1985a), analizirajući podatke iz Hamann-Toddove kolekcije (Cleveland, Ohio), otkrili su razliku u navedenoj i procijenjenoj starosti u trenutku smrti.

U postnatalnom periodu, podaci o dužini dijafiza dobiveni su iz transverzalnih i longitudinalnih istraživanja, a najčešće korišteni podaci za usporedbu s arheološkim zbirkama su oni iz zbirke sa Sveučilišta u Coloradu (Maresh, 1943) koji su obuhvaćali podatke od rođenja do postizanja vrhunca rasta u dužinu dugih kostiju udova. Problem koji nastaje jest da su svi podaci uglavnom dobiveni iz europskih uzoraka ili uzoraka potomaka Europljana iz Sjeverne Amerike te nisu primjenjivi na druge etničke populacije.

3.3.1. Pojava i morfologija osifikacijskih centara

Pojaва i morfologija osifikacijskih centara zanemareno je područje u osteologiji te postoji malo prikaza promjena koje se događaju tijekom razvoja u koštanoj anatomiji primarnih ili sekundarnih osifikacijskih centara kostura mlađih pojedinaca, što onemogućava

identifikaciju u različitim fazama. Osim radiološke vidljivosti koja je često ograničena standardnim, dvodimenzionalnim pregledom ograničenog broja kostiju, postoji malo informacija koje buhvaćaju morfološke promjene u razvoju.

Kao metoda za procjenu doživljene starosti, promjene u radiološkoj vidljivosti tijekom razvoja korištene su većinom u kliničkom kontekstu. Koštana starost, uz tjelesnu visinu djeteta, može se koristiti kako bi se predvidjela visina u odrasloj dobi (Tanner, 1978). Starost se može procjenjivati i na rubovima metafiza dugih kostiju i epifizama; svakoj se regiji dodijeli rezultat izmjerenih jedinica kako se pojedina promjena oblika događala tijekom razvoja. Svaki je koštani element tako doprinio cjelokupnom rezultatu sazrijevanju, neovisno o poretku razvoja individualnih jedinica. Ove su metode razvijene nakon što se atlas-tehnika¹² pokazala nezadovoljavajućom te na taj način istraživač nije bio ograničen fiksiranim poretkom razvoja. Garn i suradnici (1966) navode da su regije osifikacije ovisne i o spolu te je spomenuta metoda premostila taj problem, omogućavajući direktnu usporedbu spolova, zbog toga što su jedinice bile određene sazrijevanjem, ne vremenom. Ova je metoda ipak zahtjevnija i oduzima više vremena od atlas-tehnike.

Malobrojnost informacija o anatomiji ovih koštanih elemenata uzrokovana je teškom dostupnošću kostura mlađih osoba. Postmortalni uzorci su rijetki i teško se odobrava njihova analiza, zbog osjetljivosti i emocionalnih posljedica koje ostavlja smrt djeteta. U arheološkim populacijama su rijetki primjerci starosti od šeste do dvanaeste godine, jer su djeca izložena teškim uvjetima u ranim godinama života, te ako ih prežive, uglavnom doživljavaju i kasno djetinjstvo (Klepinger, 2006).

Većina hrskavičnih (endohondralnih) centara započinje okoštavanje u obliku kružnog ili jajastog čvorića kosti blizu centra hrskavice koji se šire daljnjom osifikacijom. Prema tome, svaki koštani element mora doseći kritičnu morfološku fazu prije nego li može biti identificiran i diferenciran (Scheuer, Black, 2000). Maresh (1955) je objavio rezultate longitudinalnog istraživanja provedenog na uzorku 100 dječaka i 75 djevojčica koji su bili periodički ispitivani radiografskim metodama od novorođenačke dobi do sazrijevanja dugih kostiju. Rezultati su prikazani kao 10., 25., 50. i 90. percentil te su pokazali povećanje nad pravom dužinom kostiju zbog paralakse¹³ i može varirati ovisno o kosti i debljini djeteta – 2-3% bila bi prosječna prilagodba (Hoffman, 1979). Anderson i suradnici (1963) pratili su

¹²Razni su istraživači skupljali referentne atlase specifične za određeni zglob ili topografsku regiju koji su se sastojali od niza standarda, posebnih za muškarce i žene. Skeletna starost pojedinca se procijenjivala usporedbom uzorka pojave osifikacijskih centara na radiografu određene regije sa fazama sazrijevanja u atlasima (Scheuer, Black, 2000).

¹³ Razliku između dvije točke gledišta.

razvoj 50 dječaka u dobi od desete godine i 50 djevojčica u dobi od osme godine do spajanja epifiza. Polovica djece je bila zdrava, a polovica je imala poliomijelitis (dječju paralizu) koja je pogađala ud suprotan od mjerenog. Rezultati su pokazali da nema statistički značajne razlike u rastu, neovisno o dobi i spolu pa podatkovne tablice objedinjuju obje grupe.

Većina istraživanja skeletnog rasta 20. stoljeća pokazuju rezultate za dobro njegovanu djecu europske populacije ili potomaka Europljana na drugim kontinentima, zbog čega je njihova primjena na druge etničke skupine upitna. Na brzinu i vrijeme rasta utječu obiteljski, populacijski i okolišni čimbenici kao što je prehrana pa su baze podataka ograničene u odnosu na praksu u kojoj nalazimo etničke i okolišne varijacije (Klepinger, 2006).

Prošao je niz godina od gore spomenutih longitudinalnih istraživanja te su se godišnja povećanja u rastu (u određenoj dobi) zasigurno pomakla. Zbog potencijalno štetnih nuspojava radiografskog snimanja ne mogu se izvesti nove longitudinalne studije kojima bi se ažurirali podaci o trendu povećanja rasta. Zbog toga dolazimo do fenomena nazvanog *Lake Wobegon efekt*, što znači da su sva djeca iznad prosjeka. Taj fenomen ne čini postojeće tablice nevažećima ili neupotrebljivima, nego srednje vrijednosti i standardne devijacije malo nižim, nego što bi trebale biti za zapadnoameričku djecu 21. stoljeća (Klepinger, 2006).

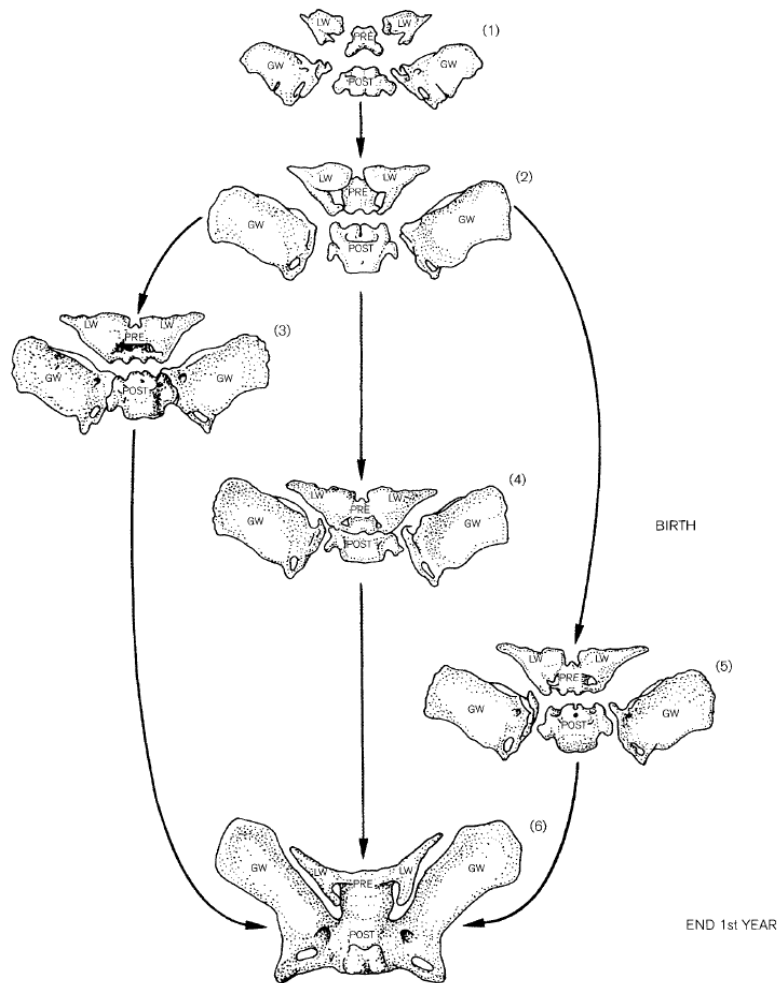
Danas se veličina i morfologija osifikacijskih centara najčešće koristi u kliničkom kontekstu, kod upotrebe ultrazvuka radi praćenja fetalnog razvoja te procjeni starosti ostataka mlađih osoba u arheološkim i forenzičnim situacijama.

3.3.2. Sraštanje osifikacijskih centara

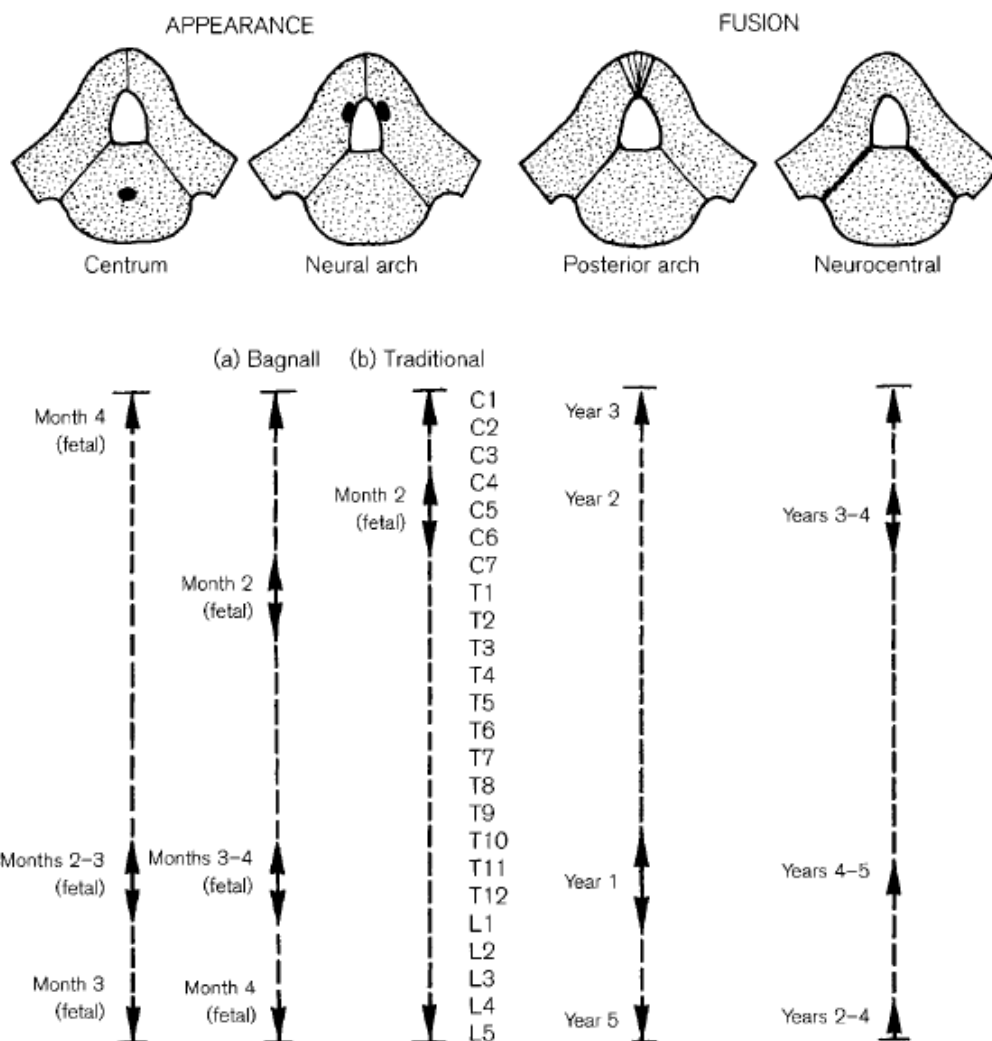
Vrijeme sraštanja varira ovisno o anatomskom položaju koštanog elementa, a djelomično o funkciji mekog tkiva koji je povezan s istim. Dijelovi kostura koji okružuju mozak i leđnu moždinu sraštaju ili prije rođenja ili u ranom djetinjstvu, što odražava rani razvoj centralnog živčanog sustava (Humphrey, 1998). Duge kosti su među zadnjim koštanim elementima koji dosežu zrelost, a sraštanje većine postkranijalnih kostiju odvija se na površini rasta između primarnog i sekundarnog centra ili epifize (Scheuer, Black, 2000). Mnogo se kostiju razvija iz jednog centra, a kasnije sraštaju šavovi (kod lubanje) ili epifizne linije (ostale kosti), dok se složene kosti razvijaju iz nekoliko primarnih centara. Postoje površine rasta između individualnih kostiju kao što je bazični šav (*synchondrosis spheno-occipitalis*) i površina rasta između sljepoočne i zatiljne kosti, ali nema sekundarnih centara, što je slučaj kod postkranijalnih elemenata kostura. Na **Slikama 1. i 2.**, vidljivo je sraštanje većine komponenata klinaste kosti i kralježnice tijekom ranog djetinjstva.

Na lubanji, anteriorna fontanela obično srašta u prve dvije postnatalne godine, a metopički šav u prvoj godini. Međutim, metopički šav ne srašta uvijek u navedenom periodu te se mora razmatrati s oprezom, ukoliko drugi indikatori pokazuju dob djeteta iznad dvije godine. Distalni dio zatiljne kosti izdržljiviji je od ostalih dijelova lubanje; lateralni dijelovi sraštaju s ljuskom između prve i treće godine života, a bazilarni dio srašta s lateralnim u dobi od pete do sedme godine (Scheuer, Black 2000). Spojnište donje čeljusti (*symphysis mandibulae*) srašta tijekom prve godine.

Pri rođenju, kralježak čine tri nesrasla elementa. Polovice neuralnih lukova u gornjoj lumbalnoj i donjoj torakalnoj regiji počinju sraštati u prvoj godini, te se sraštanje progresivno nastavlja proksimalno i distalno. Lukovi vratnih kralježaka sraštaju u drugoj godini, a niži lumbalni dijelovi do početka šeste godine života. Neuralni lukovi sraštaju s tijelom kralješka između treće i sedme godine (Klepinger, 2006). Križna kost (*os sacrum*) je do pete ili šeste godine sastavljena od pet zasebnih sakralnih kralježaka. Lateralni elementi sraštaju u ranoj adolescenciji, središnji počinju sraštati od donjeg prema gornjem dijelu u kasnijoj adolescenciji i ranoj odrasloj dobi (Scheuer, Black, 2000). Spoj S₁-S₂ uobičajeno srašta do trideset i druge godine kod muškaraca (McKern, Stewart, 1957).



Slika 1. Prikaz sraštanja klinaste kosti od prenatalnog doba do prve godine života, prema Scheuer, Black (2000:93).

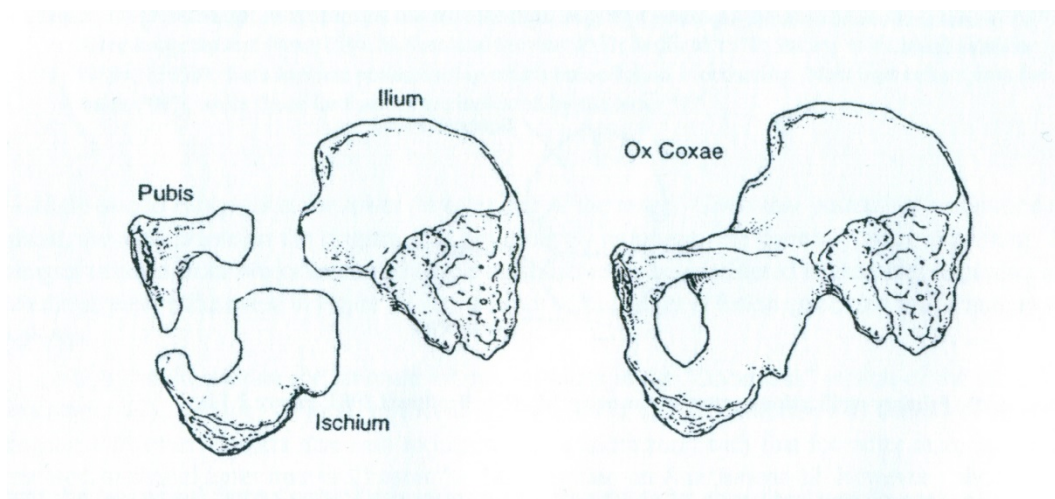


Slika 2. Prikaz generalnog obrasca pojave i sraštanja primarnih osifikacijskih centara kralježaka, odnosno njihovih centara i lukova, prema Scheuer i Black (2000:193).

Kasnije, u adolescenciji, sraštaju elementi prsne kosti (*sternum*), lopatice (*scapula*) i zdjelice (*os coxae*).

Tijelo prsne kosti se u ranom djetinjstvu sastoji od četiri elementa. Niži dijelovi mogu započeti sraštati u četvrtoj godini, središnji dio između jedanaeste i šesnaeste godine, a posljednja dva, gornja dijela sraštaju do dvadesete godine (Scheuer, Black, 2000).

Bočna kost je, kao i kralješci, trodijelna u novorođenačkoj dobi, a najprije sraštaju sjedna (*os ischii*) i stidna kost (*os pubis*) između pete i osme godine života. Početak sraštanja sa crijevnom kosti (*os ilium*) u zglobnoj čašici (*acetabulum*) započinje u dobi od deset ili jedanaest godina, završava između trinaeste i petnaeste godine kod djevojčica, a u sedamnaestoj godini kod dječaka (vidi **Sliku 3.**). Zdjelicu (*pelvis*) čine lijeva i desna bočna kost (*os coxae*), križna kost (*os sacrum*) i trtična kost (*os coccygis*).



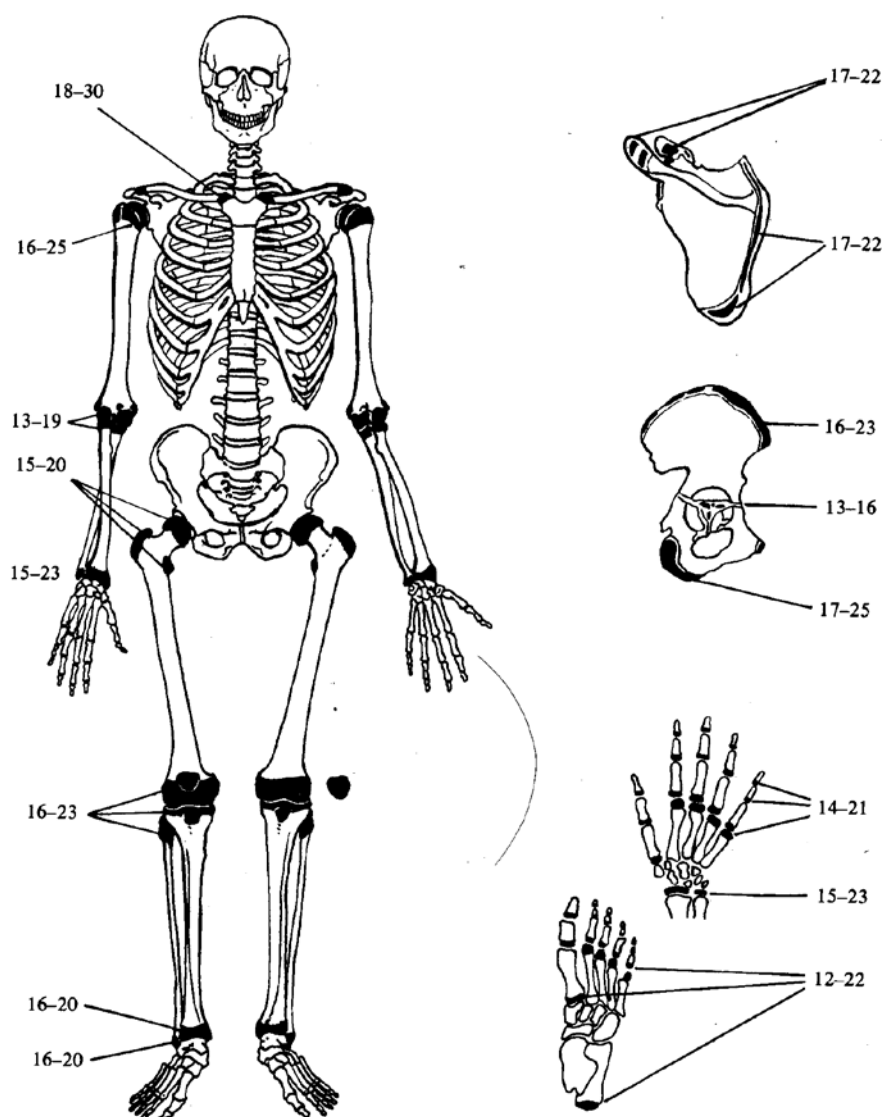
Slika 3. Primarni osifikacijski centri na bočnoj kosti (*os coxae*). Izvor: Buikstra, Ubelaker (1994), prema Steele i Bramblett (1988).

Metoda procjene starosti prema Tanner-Whitehouseu 2 (TW2) može ponekad biti korisna, ali za forenzične svrhe praktičnija je RUS metoda (*radius, ulna, short bones*) (Tanner i sur., 1975). Vrijednost metode TW2 nalazi se u dostavljanju iznimne količine podataka o sazrijevanju kostiju, opisujući varijacije. Klinička radiografska istraživanja dentalne i koštane dobi upotrebljavaju se kao standardi prema kojima će djetetu poznate dobi biti procijenjen rast i razvoj u skladu s dobnom skupinom. Procjena kronološke dobi pomoću standarda razvoja je moguća, ali je nužno uključiti varijabilitet u jednadžbu. Standardi su obično temeljeni na istraživanjima europskih populacija, pripadnika srednje klase 20. stoljeća, poznatog spola. Spol djeteta možda neće uvijek biti određen sa velikom pouzdanošću, ali je važna varijabla u određivanju vremena rasta i razvoja. Tanner (1962) tvrdi da su djevojčice uvijek skeletno naprednije i kosti im sazrijevaju, u prosjeku, dvije godine ranije nego kod dječaka. Za distalne udove korištene u RUS metodi standardna devijacija, za dječake u dobi od 5 do 16 godina i djevojčice u dobi od 5 do 14 godina, je oko jedne godine.

Krogman (1962) nudi *pravilo palca* prema kojem su djevojčice naprednije od dječaka za jednu godinu u dobi od 5 do 10 godina, dvije godine u dobi od 10 do 15 godina i ponovno jednu godinu u dobi od 15 do 20 godina. Osim među spolovima, postoje i individualne varijacije od čak 2 do 6 godina, ovisno o analiziranom anatomske elementu. Osim toga, problem određivanja starosti mlađih osoba pronalazimo u sekundarnom trendu dječje pretilosti. Preliminarni klinički rezultati pokazuju da adolescencija i zrela dob teže sve ranijim godinama, što bi se moglo odraziti na ranije skeletno sazrijevanje (Klepinger, 2001).

3.3.3. Sraštanje epifiza

Za adolescenciju i ranu odraslu dob, sraštanje sekundarnih i primarnih osifikacijskih centara jedan je od najboljih pokazatelja procjene starosti. Sraštanje epifiznih linija na bilo kojem izoliranom mjestu postupan je proces te se tragovi sraštanja mogu vidjeti još pet i više godina nakon samog završetka procesa (Klepinger, 2006). Brothwell (1981) dao je prikaz lokacija i kronologije spajanja nekih epifiza sa dijafizama postkranijalnog kostura (vidi **sliku 4.**).



Slika 4. Mjesta i kronologija sraštanja epifiza, prema Brothwellu (1981:66).

Buikstra i Ubelaker (1994) su predstavili četiri faze u kojima sraštaju epifize: *prazno* = nemoguće procijeniti; 0 = *otvoren*: epifize i dijafize u potpunosti odvojene; nema sraštanja kosti, 1 = *djelomičan spoj*: neki dijelovi epifize i dijafize su srasli, 3 = *potpuno sraštanje*: svi vidljivi aspekti epifize su srasli.¹⁴

S druge strane, McKern i Stewart (1957) dali su pet faza procesa sraštanja – inicijalna faza je bez koštanih veza, slijedi faza u kojoj metafizalni dio trabekularne kosti počinje prelaziti ploču rasta kako bi inicirao koštano sraštanje s epifizom (obično počinje u centru ploče rasta). Nakon toga se epifiza čvrsto veže, ali još uvijek je prisutan žlijeb u ravnini spoja. Vremenom, vidljiv je samo ostatak žlijeba u izoliranom području, a na kraju nema vanjskih indikatora ploče rasta.

Neki autori pokušali su ispraviti nedostatke prijašnjih metoda određivanja starosti pa je tako Flecker (1942) objavio presječno radiografsko istraživanje pojave i sraštanja osifikacijskih centara na kosturima australske djece europskog podrijetla. Veličina Fleckerova uzorka varirala je ovisno o analiziranom anatomskom elementu i položaju. Muškarci i žene su grupirani zasebno, a analiza nije bila ograničena na područje ruku i zglobova, već je uključivala i centre dugih kostiju, što je njegovu metodu činilo prigodnom za forenzičnu primjenu.

Klepinger (2006) daje pregled (vidi **Tablice 6. i 7.**) trojice autora i njihove procjene najranije, početne faze epifiznog sraštanja te fazu potpunog sraštanja u koju je uključila podatke McKerna i Stewarta.

¹⁴ U Buikstra i Ubelaker (1994) mogu se pronaći detaljniji prikazi povezanosti kronološke dobi i sraštanja osifikacijskih centara (Buikstra, Ubelaker, 1994:41-43)

Epiphysis	Flecker (1942)		Ubelaker (1989)		Scheuer and Black (2000)	
	Male	Female	Male	Female	Male	Female
Humerus: proximal	16	15 9 ^a	14	14	16	13
Humerus: distal	14 7	13 4	11	9	12	11
Medial epicondyle	12	10	15	13	14	13
Radius: proximal	14	13 10	14	13	14	11.5
Radius: distal	17 3	15 11	16	16	16	14
Ulna: proximal	—	11 10	—	—	13	12
Ulna: distal	17 3	15 0	18	16	17	15
Femur: head	14	13 4	15	13	14	12
Greater trochanter	15 10	14 4	16	13	16	14
Lesser trochanter	—	—	15	13	16	16
Femur: distal	16	14	14	14	16	14
Tibia: proximal	16	14	15	14	15	13
Tibia: distal	14 9	13	14	14	15	14
Fibula: proximal	16	14	14	14	15	12
Fibula: distal	15	14 10	14	13	15	12

^aRead as 15 years, 9 months.

Tablica 6. Prikaz procjene najranije faze sraštanja epifiza sa dijafizama dugih kostiju, prema Klepinger (2006:51)

Flecker (1942) daje podatke vlastitih promatranja, Ubelaker (1989) nije naveo izvor svojih rezultata, a Scheuer i Black (2000) dali su sažetak podataka iz njihova pregleda literature.¹⁵

Epiphysis	Flecker (1942)		Ubelaker (1989)		Scheuer and Black (2000)		McKem and Stewart (1957)
	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male
Humerus: proximal	19 2 ^a	20 5	21	20	20	17	24
Humerus: distal	16	16	15	13	17	15	17
Medial epicondyle	17 0	16	18	15	16	15	20
Radius: proximal	20 5	19 10	19	16	17	13	19
Radius: distal	23	20 5	20	19	20	17	23
Ulna: proximal	17 6	16 0	—	—	16	14	19
Ulna: distal	23	22	20	19	20	17	23
Femur: head	20 2	18 2	18	17	19	16	20
Greater trochanter	17 6	16 10	18	17	18	16	20
Lesser trochanter	17 11	16 10	17	17	17	17	20
Femur: distal	19	19	19	17	20	18	22
Tibia: proximal	19	18	19	17	19	17	23
Tibia: distal	18	16 4	18	16	18	16	20
Fibula: proximal	19 8	18	20	18	20	17	22
Fibula: distal	18	16 4	18	16	18	15	20

^aRead as 19 years, 2 months.

Tablica 7. Prikaz procjene faze potpunog sraštanja epifiza sa dijafizama dugih kostiju, prema Klepinger (2006:51).

¹⁵ Scheuer i Black (2000) dali su i najpreciznija vremena sraštanja osifikacijskih centara za pojedini anatomske element.

Bazični šav (*synchondrosis speno-occipitalis*) još je jedan od osifikacijskih centara. Za razliku od kostisvoda lubanjekoje se formiraju u procesu intermembranskog rasta¹⁶, bazični dijelovi zatiljne i klinaste, kao i duge kosti, potječu od endohondralnog okoštavanja¹⁷. Prema tome, bazični šav srašta u približno jednakom vremenskom okviru, kao i epifize dugih kostiju.

U literaturi se pronalaze različita mišljenja o vremenu sraštanja bazičnog šava. Scheuer i Black (2000) navode da bazični šav srašta u dobi od 11 do 16 godina (žene) i od 13 do 18 godina (muškarci). U **Tablici 8.** dan je pregled dijela autora¹⁸ koji su proučavali vrijeme sraštanja bazičnog šava, a razlike u vremenima moguće je objasniti različitim metodologijama.

	Age (yrs)		Numbers		Method
	Female	Male	Female	Male	
Powell and Brodie (1963)	11–14	13–16	193	205	Radiographic
Konie (1964)	10.5–13.5	12.5–16	162	152	Radiographic
Melsen (1972)	12–16	13–18	44	56	Histological
Ingervall and Thilander (1972)	>13.75*	>16	21	32	Histological
Sahni (1998)	13–17	15–19	34	50	Direct inspection
			27	46	CT scans

*Never open.

Tablica 8. Pregled autora o vremenu sraštanja bazičnog šava, prema Scheuer i Black (2000).

McKern i Stewart (1957) tvrde da je šav srastao kod većine mladih žena u dobi od 17 do 18 godina, a u potpunosti je bio srašten kod muškaraca u dobi od 21 godine. Može se samo pretpostaviti da šavovi kod žena sraštaju barem jednu godinu ranije nego kod muškaraca (Klepinger, 2006:52).

Prstenaste epifize kralježaka formiraju se i zatvaraju u adolescenciji i mladoj odrasloj dobi. Vrijeme spajanja epifiza za medijalni kraj ključne kosti i anteriorni dio grebena crijevne kosti opisano je za veliki, etnički raznolik uzorak muškaraca (n=605) i žena (n=254) iz Los Angelesa (Webb, Suchey, 1985). Autori su analizu saželi u, već spomenuto, *pravilo palca*.

Procjene su bile sljedeće:

- Za sternalni kraj ključne kosti:
 - uzorci bez vidljivog sraštanja impliciraju dob osobe do 25 godina (muškarci) te do 23 godine (žene);

¹⁶ Okoštavanje iz vezivnog tkiva.

¹⁷ Okoštavanje iz hrskavice.

¹⁸ O sraštanju bazičnog šava pisali su i Irwin (1960), Kahana, Birkby, Goldin, Hiss (2003), Akhlaghi sa suradnicima (2008,2010), Valizadeh, Gharedaghi (2008), Basset, Briggs, Drummer (2010), Das, Ghafar (2010), Shirley, Jantz (2011) i dr.

- djelomično sraštanje implicira dob osobe do 21 godine (muškarci) i od 16 do 33 godine (žene);
 - potpuno sraštanje implicira najmanju dob osobe od 21 godine za muškarce i 20 godina za žene.
- Za anteriorni dio grebena crijevne kosti:
 - uzorci bez vidljivog sraštanja impliciraju dob osobe do 19 godina (muškarci) i do 15 godina (žene);
 - djelomično sraštanje implicira dob osobe od 14 do 23 godine (oba spola);
 - potpuno sraštanje implicira dob osobe od najmanje 17 (muškarci) i od najmanje 18 godina (žene).

McKern i Stewart (1957) tvrdili su da je zadnja epifiza koja se spaja najčešće medijalni dio ključne kosti¹⁹ (približno u dvadeset prvoj godini, a sigurno do trideset prve godine kod muškaraca), s čime se slažu podaci Webba i Suchey (1985).

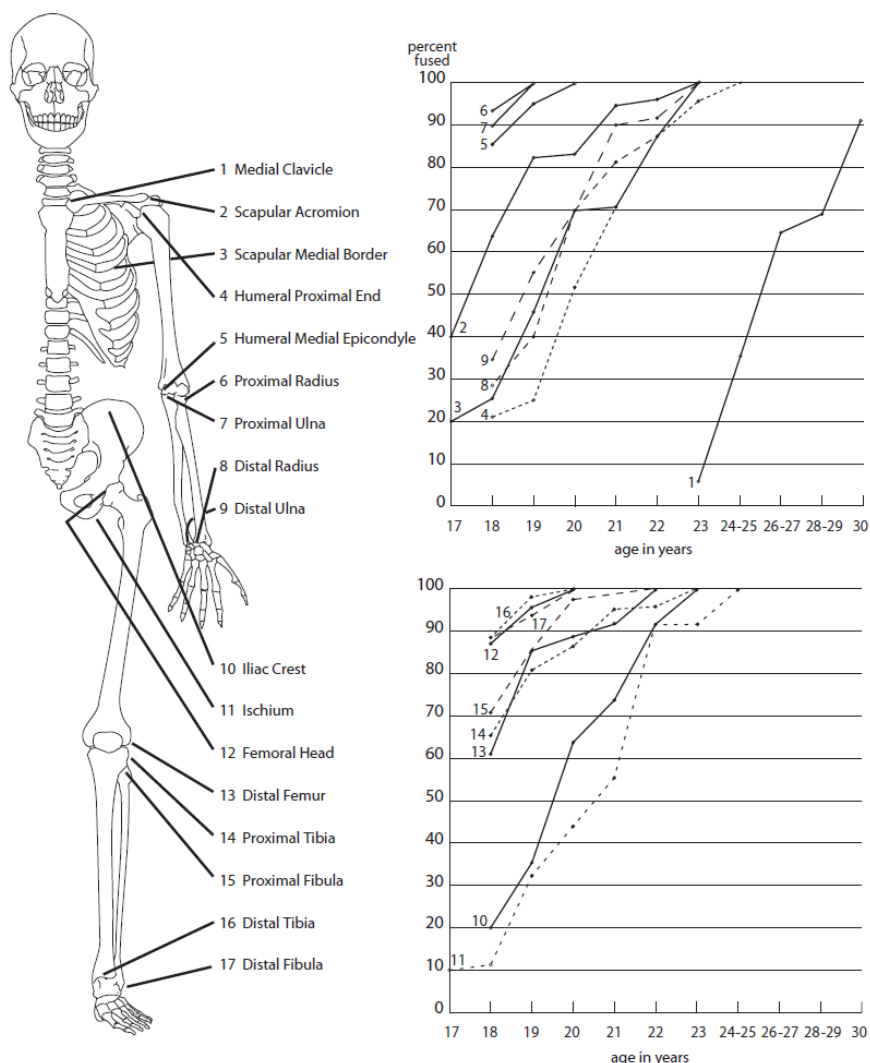
Razvoj prestaje kada se sve epifize spoje, u prosjeku, prije dvadeset i osme godine (White, Folkens, 2005).

Postoje varijacije u vremenu sraštanja epifiza za određene skeletne elemente. Na **Slici 3.** prikazana je značajna interindividualna varijacija u kronologiji spajanja epifiza za nekoliko skeletnih elemenata na uzorku poginulih muškaraca u Korejskom ratu (McKern, Stewart, 1957). Kada je u pitanju medijalni dio ključne kosti, autori su uvidjeli da deset pojedinaca u dobi od 17 godina nije imalo spojene epifize²⁰. Najmlađa osoba koja je imala spojene epifize umrla je u dvadeset trećoj godini. Istraživanje je pokazalo da su drugi doživjeli dob od 31 godine, prije nego su epifizne linije potpuno srasle.

¹⁹ Ključna kost prva je kost kod koje su vidljivi znakovi osifikacije, ali zbog položaja epifize (medijalni dio) zadnja srašta.

²⁰ Epifizna čašica ključne kosti se počinje spajati s medijalnim dijelom ključne kosti već u dobi od 18 godina, ali sraštanje može započeti u bilo kojoj dobi između 18 i 25 godina (McKern, Stewart, 1957).

Slika 5. prikazuje graf na kojem je naveden postotak muškaraca kod kojih je vidljivo potpuno spajanje epifiza u određenoj dobi.



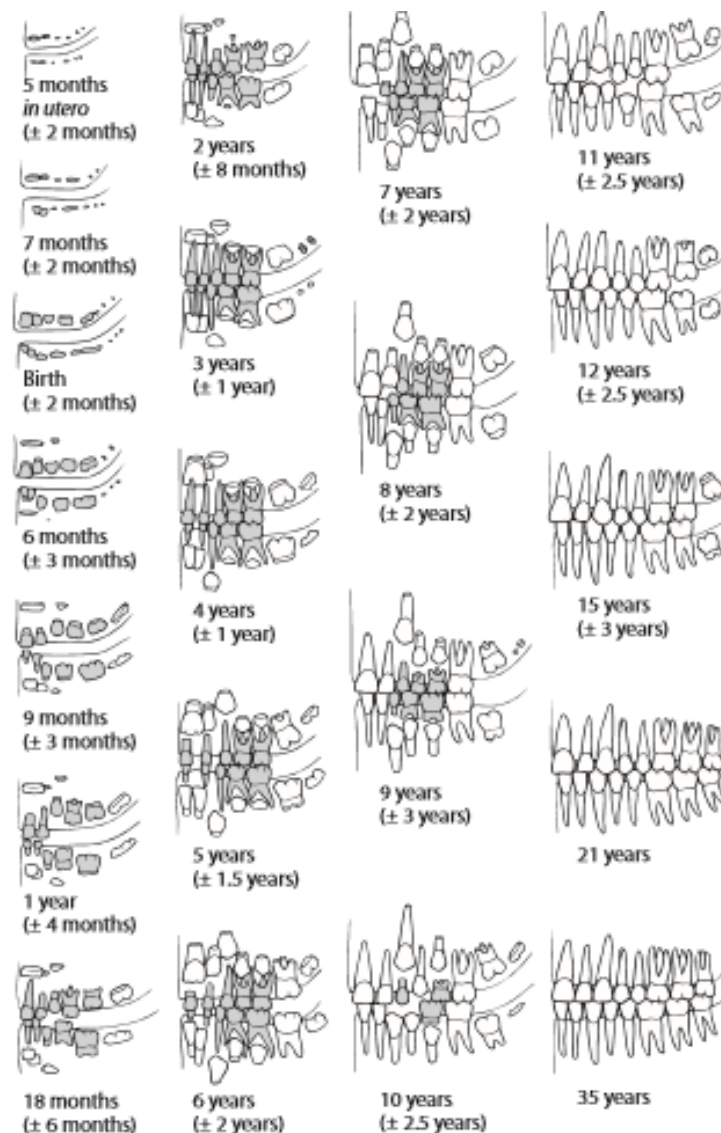
Slika 5. Varijacija u kronologiji spajanja epifiza, prema White, Folkens (2005:372).

Postoji nekoliko metodoloških problema vezanih uz sraštanje epifiza. Teško je utvrditi razliku između pojedinih faza te su se, s povećanjem broja faza, povećavale pogreške. Također je teško povezati izravna promatranja na kostima i radiografske snimke (Klepinger, 2006). Na vrijeme sraštanja utječu varijacije na početku razvoja u adolescenciji i ni jedan rad ne daje apsolutne raspone dobi ili spolne razlike. Zbog toga što sekundarne spolne razlike nisu izražene na kosturu do adolescencije, nije moguće odrediti spol kod ostataka mladih osoba što komplicira precizniju procjenu sraštanja u tom uzorku (Klepinger, 2006).

3.3.4. Procjena dentalne starosti

Dentalni ostaci imaju nekoliko prednosti nad skeletnim. Kao prvo, otporniji su i zbog toga se češće nalaze u arheološkim i paleontološkim kontekstima, što je od iznimne važnosti za stručnjake. Zubi su često jedina struktura koja predstavlja fosilne vrste i u recentnijim skeletnim nalazištima te su najčešće najmanje oštećeni. Drugo, razvoj mliječnih i trajnih zuba započinje već u embriološkom periodu i završava tijekom kasne adolescencije. Kao treći razlog navodimo činjenicu da u živućim populacijama za određenu kronološku dob, dentalna pokazuje manje varijabilnosti od skeletne dobi. Dentalni razvoj pod većim je utjecajem genetike, nego li pod utjecajem vanjskih okolišnih ili fizioloških čimbenika te se u većem postotku poklapa sa kronološkom dobi od skeletne (Lewis i Garn, 1960). Pretpostavlja se da bi razlog tome mogao bit zaštićen prenatalni okoliš u kojem se odvija razvoj gotovo svih mliječnih i dijela trajnih zuba (Scheuer, Black, 2000), odnosno manji utjecaj vanjskih faktora.

Na **Slici 6.** prikazani su rezultati istraživanja Ubelakera (1989) provedenih na populaciji američkih Indijanaca te njegov prikaz dentalnog razvoja.

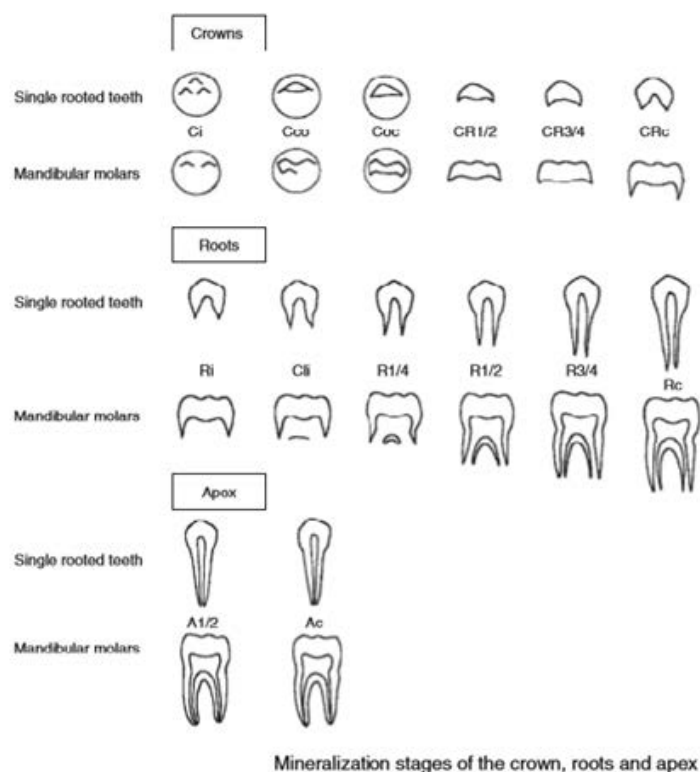


Slika 6. Dentalni razvoj kod Američkih Indijanaca, prema Ubelaker (1989).

Kod određivanja dentalne starosti mlađih jedinki u obzir se uzimaju dva indikatora - mineralizacija krune i korijena te izbijanje zuba. Lewis i Garn (1960) navode da na mineralizaciju manje utječu intrinzični i ekstrinzični faktori, a na izbijanje zuba mogu utjecati vanjski faktori, kao što je prehrana ili lokalni uvjeti (rani gubitak mliječnih zuba ili neadekvatan prostor u čeljusti) (Haavikko, 1973).

Za razliku od izbijanja zuba, faze mineralizacije se mogu promatrati bilo kada tijekom razvoja denticije. Moorrees i suradnici (1963) analizirali su intraoralne radiografske podatke 48 dječaka i 51 djevojčice iz Bostona te radiografske podatke 136 dječaka i 110 djevojčica uključenih u longitudinalnu studiju iz Fels Research Institute programa u Yellow Springsu,

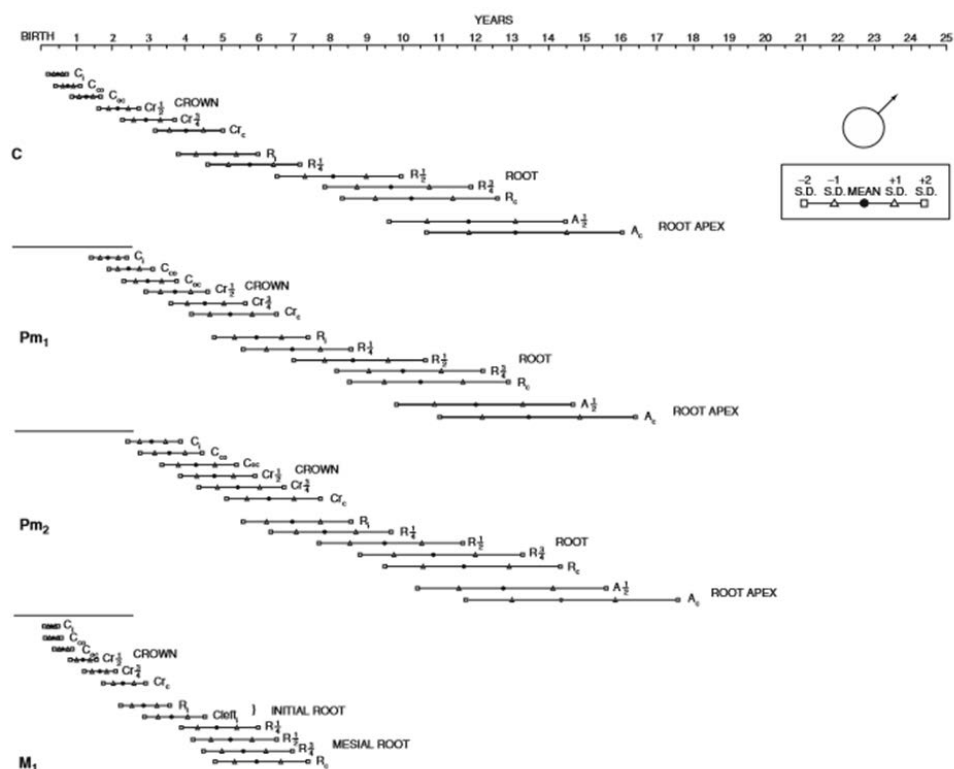
Ohio. Faze mineralizacije i njihove definicije prikazane su na **Slikama 7. i 8.**, a rezultati istraživanja na **Slikama 9.-12.**



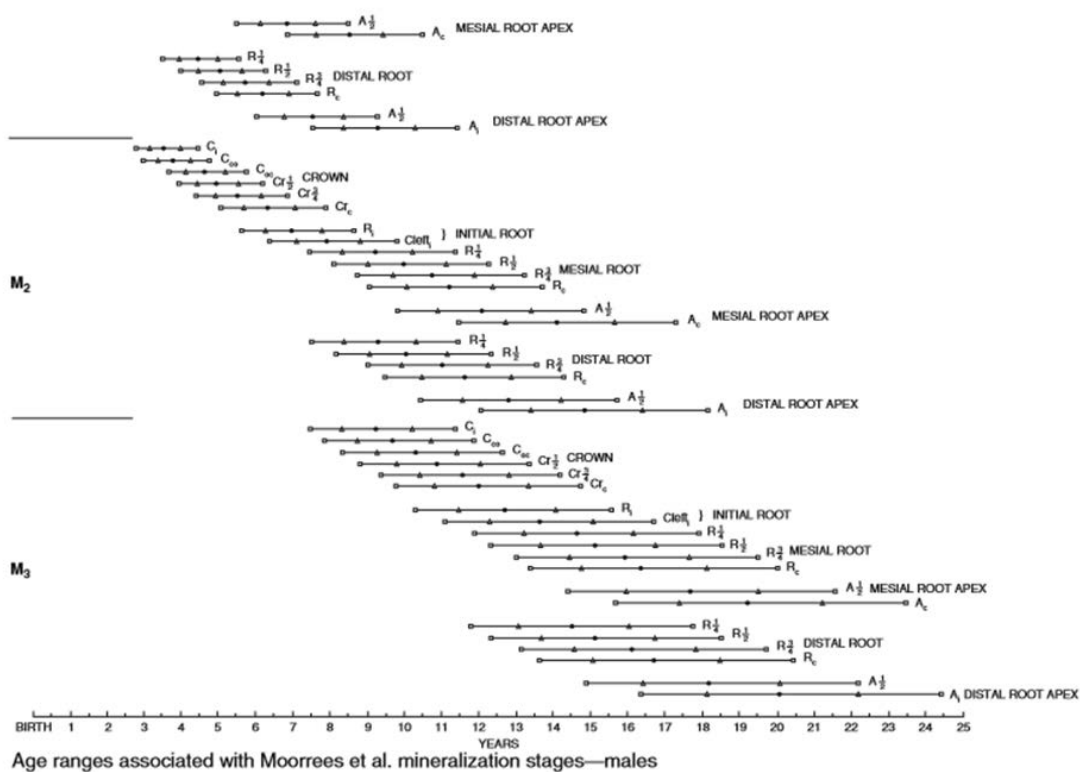
Slika 7. Faze mineralizacije krune, korijena i vrha korijena (*apex radialis dentis*), prema Moorrees i sur. (1963).

Definition of Tooth Formation Stages	
C _i	Initial cusp formation
C _{co}	Coalescence of cusps
C _{cc}	Cusp outline complete
CR _{1/2}	Crown half complete
CR _{3/4}	Crown three-quarters complete
CR _c	Crown complete
R _i	Initial root formation
C _i	Initial cleft formation
R _{1/4}	Root length quarter
R _{1/2}	Root length half
R _{3/4}	Root length three-quarters
R _c	Root length complete
A _{1/2}	Apex half closed
A _c	Apical closure complete

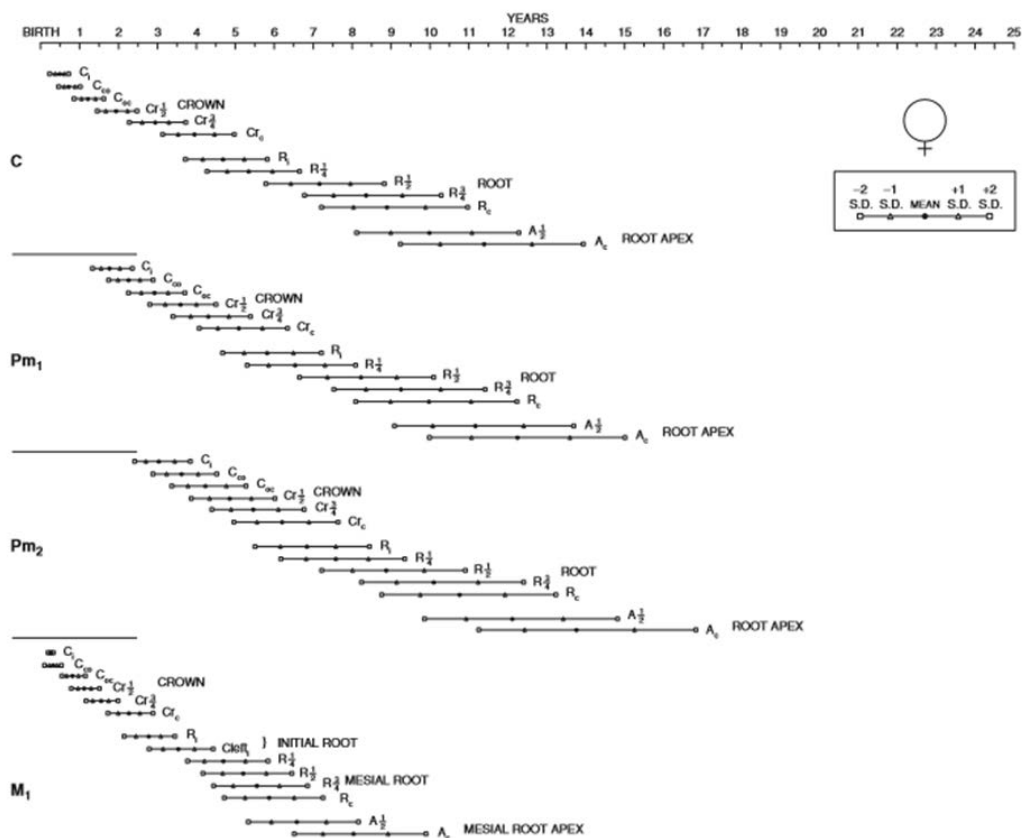
Slika 8. Definicije faza formiranja zuba, prema Moorrees i sur. (1963).



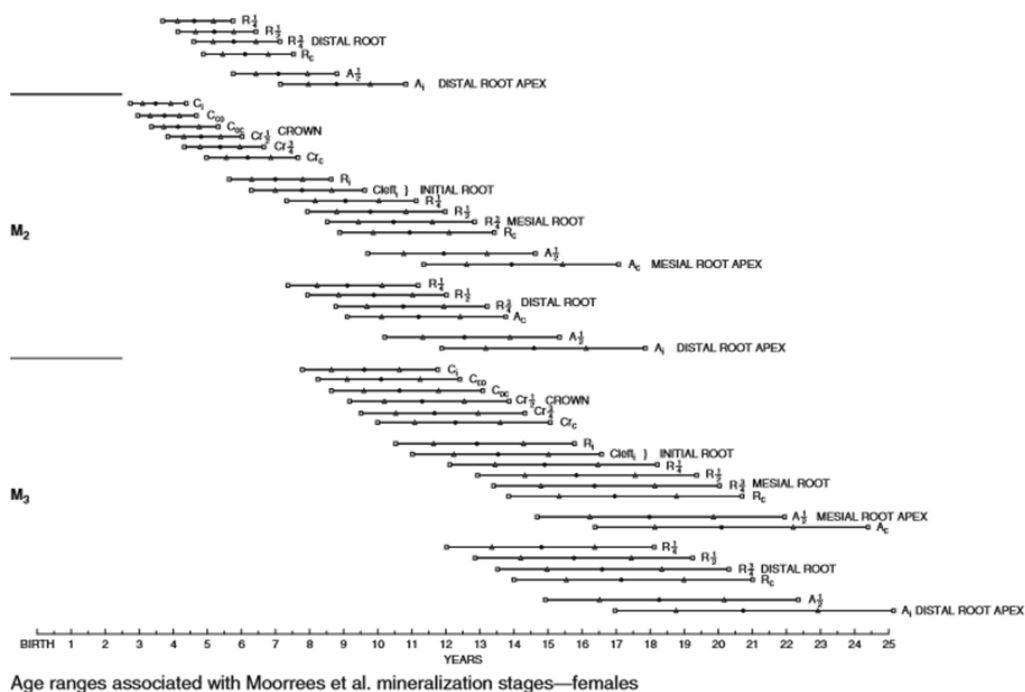
Slika 9. Rasponi dobi povezanih sa fazama mineralizacije kod muškaraca, prema Moorrees i sur. (1963).



Slika 10. Rasponi dobi povezanih sa fazama mineralizacije kod muškaraca, prema Moorrees i sur. (1963).



Slika 11. Rasponi dobi povezanih sa fazama mineralizacije kod žena, prema Moorrees i sur. (1963)



Slika 12. Rasponi dobi povezanih sa fazama mineralizacije kod žena, prema Moorrees i sur. (1963)

Smith (2004) je pratio šestogodišnje podatke iz uzorka koji se sastojao od 42 dječaka i 36 djevojčica iz Montreala starosti od 10 do 15 godina. Ovom je analizom htio pokazati razliku stvarne kronološke dobi i one koja je rezultat između dentalne i skeletne dobi u odnosu na kronološku. Zaključio je: „Rezultat iz francusko-kanadskog uzorka iz Montreala pokazuje da, iako se za dio uzorka skeletna i dentalna dob dosta dobro poklapaju, postoji i značajna individualna varijacija među modernom djecom u vremenu skeletnog razvoja relativnog prema dentalnom. Unatoč tome, skeletna dob koja prednjači 2 ili više godina nad dentalnom tijekom adolescencije, iznimno je rijetka (Smith, 2004:119).

Demirjian (1973) je naveo da se gotovo sve studije izbijanja denticije odnose na samu pojavu zuba (i tako se pogrešno koristi termin *izbijanja* ili *erupcije*), a ne na cijeli proces pomicanja zuba od dubine alveolarne kosti do okluzalne razine²¹. Sa suradnicima je predstavio sistem procjene dentalne starosti koji je uključivao sedam zuba na lijevoj strani donje čeljusti. Radiografski je snimano 1446 dječaka i 1482 djevojčice francusko-kanadskog podrijetla, a faze razvoja podijeljene su u osam faza i označene slovima od A do H. Svakoj je fazi pripisana brojčana vrijednost temeljena na metodi procjene skeletne zrelosti Tannera, Whitehousa i Healyja. Zbrojene brojčane vrijednosti svih sedam zuba daju rezultat dentalne zrelosti pojedinca. Navodi kako je ova metoda primjenjiva samo na osobama starosti od 3 do 7 godina. Nekoliko godina kasnije, u suradnji sa Goldsteinom (1976) revidirao je prvotnu metodu te je predstavio tri dodatne. U prvoj je analiza ponovno uključivala sedam zuba, ali je dodao dvije nove faze te je povećan uzorak. Druge dvije metode uključuju 4 zuba, ali u dvije različite kombinacije (prvi i drugi pretkutnjak, prvi i drugi kutnjak - drugi sjekutić, prvi i drugi pretkutnjak, drugi kutnjak).

Willems i suradnici (2001) testirali su tehniku Demirjiana procjenjujući dob na uzorku 1029 dječaka i 1087 djevojčica belgijskog podrijetla pomoću ortopantograma. Zaključak analize bio je da Demirjianova tehnika precjenjuje kronološku dob te su predstavili vlastitu metodu koja je na koncu pokazala preciznije rezultate.

Važno je naglasiti da postoje spolne i populacijske varijacije u dentalnom razvoju. Harris i McKee (1990) pokazali su da je dentalni razvoj brži kod žena, no taj je spolni dimorfizam posebno istaknut kod potomaka afričkih populacija.

Kao i sa ispitivanjem pojave osifikacijskih centara, većina fazarazvoja denticije analizirana je histološki, koristeći uzorke abortiranih fetusa. Postnatalno se odvija razvoj korijena mliječnih zuba i rane faze formiranja krune trajnih zuba. Istraživanja denticije u

²¹ U kliničkom kontekstu, pojava se definira kao vrijeme u kojem bilo koji dio zuba prodre kroz gingivu ili kada alveolarni zid resorbira na okluzalnoj površini (Scheuer, Black, 2000).

mlađoj dobi žive djece u kojima su korištene radiografske metode često su etički upitna, zbog mogućih negativnih posljedica na zdravlje ispitivane djece. Arheološki i fosilni uzorci snimani su radiografski, s obzirom da spomenuti rizik ne postoji.

3.4. Određivanje starosti u odrasloj dobi

Fiziološka odrasla dob načelno započinje od dvadeset i pete godine života, a nakon srednjih dvadesetih godina svi su zubi izbili, većina je epifiza spojena s dijafizama te je završen longitudinalni rast. U ovoj dobi, rast i razvoj više nisu faktori prema kojima se možemo voditi u analizi, već makromorfološke promjene na kostima. S obzirom da promjene nisu nužno uzrokovane starenjem, već i drugim faktorima kao što je bolest, preciznost procjene doživljene starosti je manja. S time na umu, kod mnogih se istraživanja pojavio trend precjenjivanja starosti mlađih osoba i podcjenjivanja starosti starijih osoba što potvrđuju svi testovi individualnih i višestrukih kriterija (Molleson, Cox, 1993).

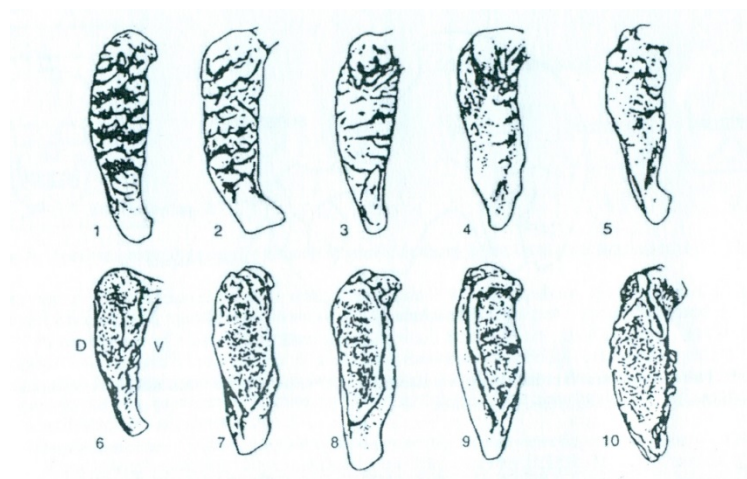
Najčešće istraživani segmenti u određivanju starosti skeletnih ostataka odraslih osoba je morfologija preponskog spojišta (Todd, 1920., McKern i Stewart, 1957., Ubelaker, 1989., Meindl i Lovejoy, 1989., Brooks i Suchey, 1990.), uškaste površine crijevne kosti (Lovejoy i sur., 1985.) i morfološke promjene sternalnog kraja rebra (Işcan i sur., 1984, 1985, 1987). Sraštanje šavova lubanje (Todd i Lyon, 1924) koristi se kao sekundarna metoda, a još se analiziraju i morfološke promjene na nepčanoj kosti (sraštanje palatinskih šavova) te osteoartrične promjene na zglobnim ploštinama i kralježnici.

3.4.1. Površina preponskog spojišta (*symphysis pubis*)

Prva je studija o određivanju starosti iz morfologije preponskog spojišta bila Toddov (1920) opis starosnih promjena kod muškaraca europskog podrijetla temeljena na 306 kostura iz kolekcije Sveučilišta Western Reserve, danas poznata pod nazivom Hamann-Toddova kolekcija. Todd je svoja promatranja sažeo u deset faza, u rasponu od 18 do 50 i više godina. Toddovih deset faza²² prikazuju morfološke promjene na površini preponskog spojišta. Okarakterizirao je nekoliko glavnih indikatora koji su se mijenjali ovisno o dobi – hrapavost

²²**Faza I.** (18-19 godina), **Faza II.** (20-21 godinu), **Faza III.** (22-24 godine), **Faza IV.** (25-26), **Faza V.** (27-30 godina), **Faza VI.** (30-35 godina), **Faza VII.** (35-39 godina), **Faza VIII.** (40-45 godina), **Faza IX.** (46-49 godina), **Faza X.** (50+ godina)

površine, prisutnost grebena i žlijebova, razgraničavanje gornjeg i donjeg dijela ploštine, prisutnost koštanih čvorića, razvitak dorzalnog i ventralnog ruba te kosina i pojava degenerativnih promjena i osifikacija. *Hrapavost i prisutnost grebena te žlijebova* glavne su karakteristike prve i druge faze; u kasnijim fazama mogu biti jedva vidljivi, dok je u posljednoj fazi površina glatka. *Gornji i donji dio ploštine počinje sa razgraničavanjem* donjeg dijela tek u četvrtoj fazi, a završava nakon šeste faze. U drugoj fazi postoji mogućnost pojave *koštanih čvorića* koji se spajaju sa gornjim dijelom ploštine te *formiranje dorzalnog ruba i ventralne kosine*, koji su u petoj fazi jasno definirani i s oštrijim nakošenjem. U sedmoj se fazi pojavljuju manje promjene na površini i ventralnom rubu, a u osmoj su vidljiva *okoštavanja* na hvatištima tetiva i ligamenata. Devetu fazu karakterizira prisutnost *pravilnih okoštavanja na dorzalnog rubu i nepravilnih na ventralnom*. *Erozija* i nepravilna okoštavanja vidljiva su u posljednjoj fazi te su izraženija sa starenjem.



Slika 13. Morfološke promjene na preponskom spojištu – Toddovih deset faza. Izvor: Ubelaker (1994), prema McKernu i Stewartu (1957), crtež: Zbigniew Jastrzebski.

Nakon objave Toddovog sustava, drugi su ga znanstvenici testirali te su predstavili vlastite sustave. McKern i Stewart (1957) predložili su trodijelni sustav za procjenu starosti temeljenu na uzorku američkih žrtava iz Korejskog rata. Uzorak je bio isključivo muški i starosti do 35 godina. Iako je prednost ovog modela bila poznata starost (za razliku od Hamann-Toddove kolekcije koja je uključivala pojedince procjenjene starosti u trenutku smrti), upravo je mana bila to što je uzorak uključivao samo muškarce.

Suchey i Brooks (1990) dali su posljednji, revidirani oblik postavljenih standarda koji su temeljili na velikom uzorku iz Los Angelesa. Bio je to etnički raznolik uzorak muškaraca (n=739) i žena (n=273) te su sa statističarem Katzom napravili novi sustav koji se sastoji od

šest faza. U svakoj fazirazlikuju rani i kasni stadij, a uključena je i srednja vrijednost doživljene starosti, standardne devijacije i raspon godina tijekom kojeg se to razdoblje javlja.

- **Faza I.** – hrapava površina ispresijecana transversalnim grebenima; razvija se ventralna kosina; superiorno moguća pojava koštanih čvorića; gornji i donji dio ploštine nemoguće razlučiti.

Spol	Središnja vrijednost doživljene starosti	Standardna devijacija	Ukupni raspon godina tijekom kojeg se odvija to razdoblje
Žene	19,4 godine	2,6 godina	15-24 godine
Muškarci	18,5 godina	2,1 godine	15-23 godine

- **Faza II.** – moguć vidljivi grebena, početak razdvajanja gornjeg i donjeg dijela ploštine, mogući razvitak širokog ventralnog grebena.

Spol	Središnja vrijednost doživljene starosti	Standardna devijacija	Ukupni raspon godina tijekom kojeg se odvija to razdoblje
Žene	25 godina	4,9 godine	19-40godina
Muškarci	23,4 godine	3,6 godine	19-34godine

- **Faza III.** – završetak procesa nastajanja donjeg dijela ploštine i ventralnog grebena; vidljivi koštani čvorići na superiornom dijelu ploštine i duž ventralne granice; moguće prisutni plitki grebeni; na dorzalnom rubu još nema okoštavanja.

Spol	Središnja vrijednost doživljene starosti	Standardna devijacija	Ukupni raspon godina tijekom kojeg se odvija to razdoblje
Žene	30,7 godina	8,1 godina	21-53 godine
Muškarci	28,7 godina	6,5 godina	21-46 godina

- **Faza IV.** – površina je sitno zrnasta; mogu biti vidljivi ostaci grebena i brazdi; spoj postaje ovalan; moguće nastajanje tankog ruba i pojava hipertrofične kosti na ventralnoj strani donjeg dijela te degenerativnih promjena na dorzalnoj strani.

Spol	Središnja vrijednost doživljene starosti	Standardna devijacija	Ukupni raspon godina tijekom kojeg se odvija to razdoblje
Žene	38,1 godina	10,9 godina	26-70 godina
Muškarci	35,2 godina	9,4 godina	23-57 godina

- **Faza V.** – pojava tankog koštanog grebena oko ploštine; početak udubljenja površine; pojava hipertrofične kosti na dorzalnoj strani i koštana izraslina na ventralnoj strani; nema erozije na rubovima.

Spol	Središnja vrijednost doživljene starosti	Standardna devijacija	Ukupni raspon godina tijekom kojeg se odvija to razdoblje
Žene	48,1 godina	14,6 godina	25-83 godine
Muškarci	45,6 godina	10,4 godina	27-66 godina

- **Faza VI.** – povećava se udubljenje ploštine; pojava naglašenih koštanih izraslina; pojava poroziteta (čak i kratera); spoj poprima nepravilni oblik.

Spol	Središnja vrijednost doživljene starosti	Standardna devijacija	Ukupni raspon godina tijekom kojeg se odvija to razdoblje
Žene	60,0 godina	12,4 godine	42-87 godina
Muškarci	61,2 godina	12,2 godina	34-86 godina

Testiranje ove metode na azijskom uzorku (n= 65) srednje i starije dobi (Schmitt,2004) pokazalo je da pouzdanost procjene pada kada se primjeni na populaciji drugačijoj od sjevernoameričke urbane grupe na kojoj je temeljena.

Sarajlić i Gradašćević (2012) testirali su Suchey-Brooks metodu na uzorku 120 preponskih spojišta muškaraca, u dobi od 19 do 86 godina, nestalih na području sjeverozapadne Bosne tijekom Domovinskog rata, čiji su ostaci prethodno identificirani. Statistička analiza je pokazala da je najmanja devijacija pronađena u drugoj fazi, dok je najveća bila u četvrtoj. Zaključili su da metoda većinom podcjenjuje stvarnu kronološku dob, ali navode da je podcjenjivanje i precjenjivanje moguće u bilo kojoj fazi i to pripisuju biološkoj varijaciji.

S obzirom da je preponsko spojište izrazito krhak koštani dio te se zbog toga rijetko nalazi na arheološkim nalazištima (ili je jako oštećen), istraživači su se okrenuli istraživanju uškaste površine crijevne kosti.

3.4.2. Uškasta površina (*facies auricularis*) crijevne kosti

Preponsko spojište delikatan je skeletni element te je sklon postmortalnom oštećenju i rijede ga se pronaći na arheološkim nalazištima. Uškasta površina crijevne kosti čvršća je i može izdržati teške uvjete te se, za razliku od preponskog spojišta, promjene protežu i na dob do osamdeset godina.

Lovejoy i suradnici (1985) ponudili su metodu procjene starosti temeljenu na analizi velikog broja uzoraka, primjenjivu na oba spola, ali su mnogi uzorci bili nepoznate dobi. Njihova se metoda sastojala od osam faza pravilnih promjena na uškastoj površini praćenih nizom fotografija.

- **Faza I.** (20-24 godine) – uškasta površina fino zrnata te pokrivena blagim valovima uzduž cijele ploštine. Nema degenerativnih promjena ni na površini ni na rubovima;
- **Faza II.** (25-29 godina) – nema mnogo promjena u odnosu na prvu fazu. Valovitost je slabije vidljiva, te se pojavljuju sitni urezi (strije);
- **Faza III.** (30-34 godine) – površina postaje grublja, valovi u potpunosti nestaju dok se povećava količina strija. Mijenja se iz fino zrnate u grubo zrnatu i potpuno gubi valovit izgled. Broj i gustoća strija povećavaju se. Mogu se pojaviti mala područja mikroporoznosti;
- **Faza IV.** (35-39 godina) – površina je grubo zrnata, a većina strija je nestala. Mogu se pojaviti blage degenerativne promjene na rubovima ili područja mikroporoznosti, ali nema vidljive makroporoznosti;

- **Faza V.** (40-44 godine) – grubo zrnatu površinu postupno zamjenjuje gusta tvrda kost, a strije više nisu vidljive (ili u minimalnoj mjeri). Povećava se razina mikroporoznosti, a moguća je i pojava makroporoznosti (rijetko);
- **Faza VI.** (45-49 godina) – površinu u potpunosti čini gusta tvrda kost. Rubovi su nepravilniji, a makroporoznost je još uvijek blaga. Mikroporoznost je nestala zbog gustoće kosti;
- **Faza VII.** (50-60 godina) – površina uškaste površine postaje izrazito nepravilna s naglašenom makroporoznošću. Na inferiornom dijelu površine pojavljuju se degenerativne promjene, a povećala se i nepravilnost rubova;
- **Faza VIII.** (60 i više godina) – izražena nepravilnost uškaste površine, pojava makroporoznosti (1/3 slučajeva) i nepravilnosti s vidljivim uništenjem subhondralne kosti. Rubovi postaju jako nepravilni i ukošeni, s degenerativnim promjenama na zglobovima.

Mnogi su znanstvenici ispitivali ovu metodu. Murray i Murray (1991) su pokazali da etnička pripadnosti spol zaista ne utječu značajno na degenerativne promjene, ali su također zaključili da raspon starosnih faza podcjenjuje starost kod najmlađe, a posebno kod najstarije dobne skupine.

Schmitt (2004) je također testirao metodu na uškastoj površini crijevne kosti vodeći se podacima dobivenim iz azijskog uzorka, a zaključili su da metoda drastično podcjenjuje dob – samo je 7% individua dobro klasificirano unutar raspona od 5 godina.

Osbourne i suradnici (2004) iskoristili su 262 uzorka iz Terry i Bass kolekcije poznate dobi u trenutku smrti te su modificirali metodu Lovejoya i suradnika. Među nezavisnim varijablama – spol, podrijetlo (i kombinacija dvoje spomenutih) i dob, jedino je posljednja pokazala značajnu korelaciju s indikatorima površinske faze. Ova metoda još nije provjerena te će nakon testiranja biti utvrđena njena efikasnost.

3.4.3. Procjena starosti pomoću promjena na sternalnim krajevima rebra

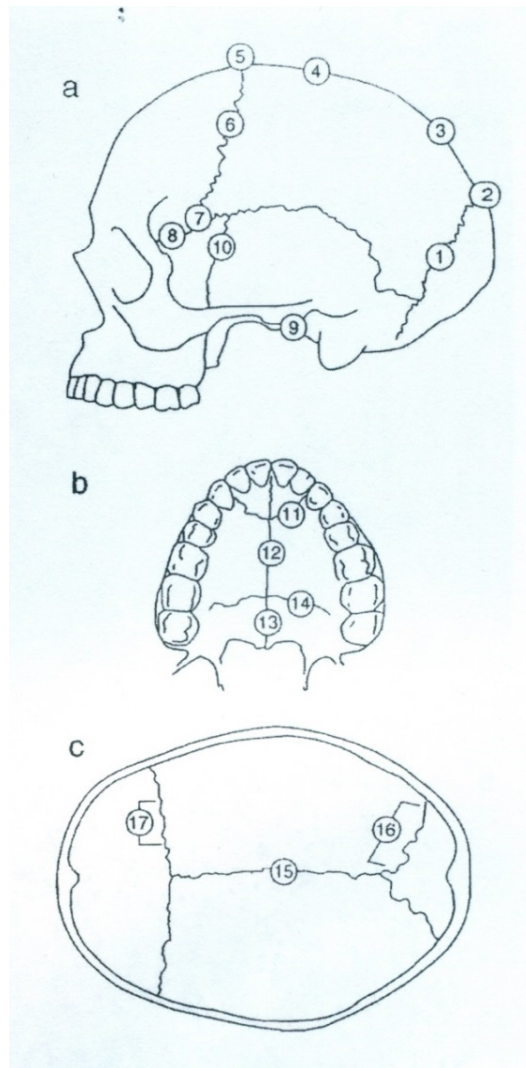
Işcan i suradnici (1984, 1985, 1987) pokrenuli su niz istraživanja o morfološkim promjenama na sternalnom kraju rebra povezanih sa starenjem. Prvi opis faza (1984) temeljen je na uzorku od 108 muškaraca europskog podrijetla iz okruga Broward na Floridi. Podaci potječu iz Ureda medicinskog istražitelja tog okruga. Opis faza za uzorke ženskih osoba napravljen je godinu dana kasnije na 83 uzorka, iz istog izvora²³. Tablice sa statističkim rezultatima pokazuju varijabilnost veličine uzorka, ovisno o fazi – od niske n=1 do visoke n=8. Tablica za svaku fazu uključuje srednju vrijednost, standardnu devijaciju, standardnu pogrešku i interval pouzdanosti od 95% te raspon dobi. Kasnije, svi su ovi parametri odbačeni, osim raspona dobi. Işcan i Loth (1986) tvrde da treće i peto rebro često pokazuju isti vremenski poredak morfoloških promjena kao i četvrto rebro, a s obzirom da ih se teško razlikuje (ukoliko nisu u potpunosti očuvana) ista se metoda koristi i na spomenutim rebrima. Studija Işcana i suradnika (1987) pokazala je da se ovi standardi ne mogu primjenjivati na afričkoj populaciji, s obzirom da postoji značajna razlika u odnosu na europsku.

Hartnett (2010) je u svojoj studiji, vodeći se parametrima Işcana i Lotha, utvrdila da je korelacija procijenjene dobi iz sternalnog kraja četvrtog rebra i kronološke dobi veća u odnosu na korelaciju preponskog spojišta i kronološke dobi.

3.4.4. Sraštanje šavova lubanje

Iako šavovi lubanjesraštaju sa starenjem osobe, postoji velika varijacija u stopi sraštanja, stoga je prihvaćena kao sekundarna metoda odredbe doživljene starosti. Podaci o sraštanju šavova lubanje mogu biti korisni kada nisu prisutni drugi kriteriji za određivanje starosti ili kada se koriste u kombinaciji s drugim metodama (Acsádi, Nemeskéri, 1970, Meindl, Lovejoy, 1985). Stupanj sraštanja može se zabilježiti za 10 ektokranijalnih, 4 palatalna i 3 endokranijalna šava.

²³ Fotografije 8 odraslih faza za ženski i muški spol mogu se pronaći u Işcan i Loth (1986).



Slika 14. Prikaz redoslijeda zatvaranja kranijalnih šavova. Izvor: Buikstra, Ubelaker (1994), prema Mann i sur.(1987), Meindl i Lovejoy (1985:59), Todd i Lyon (1924,1925a-c).

Ovu je tehniku razvila nekolicina znanstvenika - Baker (1984.), Mann i suradnici (1987), Meindl i Lovejoy(1985), Todd i Lyon (1924., 1925a, 1925b, 1925c). Stupanj sraštanja za sve segmente trebao bi se iskazati sljedećim fazama(Buikstra, Ubelaker, 1994.):

prazno = ne može se odrediti

- 0 = *otvoren* – nema dokaza o ektokranijalnom sraštanju;
- 1 = *minimalno sraštanje* –vidljivo je djelomično sraštanje. Rezultat se vrednuje u rasponu od bilo kojeg minimalnog do srednjeg stupnja sraštanja;
- 2 = *značajno sraštanje* – zabilježen je značajan stupanj sraštanja, ali neki dijelovi su još otvoreni;
- 3 = *kompletno sraštanje* – šavovi su u potpunosti srasli.

Key i suradnici (1994) su analizom na uzorku poznate dobi (16. stoljeće, londonska kriptna Crkve Isusove, Spitalfields) pokazali veliku varijabilnost u vremenu sraštanja šavova. Stoga su izvedeni široki dobni rasponi, a metode su se mogle primijeniti samo na starosti do 50 godina, zbog naprednijeg sraštanja unutarnje površine lubanje.

Acsádi i Nemeskéri (1970) također su predložili sustav koji uključuje sraštanje šavova lubanje i degradaciju spužvaste kosti proksimalnih epifiza nadlaktične i nadkoljenične kosti. Međutim, oni su iste standarde primjenjivali na oba spola, što nije bilo prihvaćeno u znanstvenoj zajednici.

Osim toga, daljnjim se testiranjem pokazalo da se otvoreni ektokranijalni šavovi mogu naći u svim dobnim rasponima sa jednakom učestalošću, što umanjuje preciznost određivanja starosti, zbog čega se danas sraštanje šavova analizira samo na endokranijalnim šavovima.

Klepinger (2006) sraštanje šavova lubanje ne smatra preciznim indikatorom doživljene starosti, te ga ignorira ukoliko se mogu iskoristiti drugi pokazatelji. Predlaže korištenje Nawrockijevih (1998) regresijskih formula za razne kombinacije endo- i ektokranijalnih šavova te nepčanog šava kao sekundarne metode.

3.4.5. Ostali skeletni indikatori određivanja doživljenestarosti

Osim dosad navedenih indikatora, postoje i drugi prema kojima se može odrediti doživljena starost, ali se moraju uzeti s oprezom i više kao sugestivni vodiči, nego li kao fiksne vrijednosti. Ove se promjene odnose na degenerativne promjene na zglobovima i kralježnici, promjena na hvatištima mišića, ligamenata i tetiva, okoštavanje hrskavice te sraštanje palatinskih šavova. Kod ovih indikatora, dobni rasponi nisu precizno definirani ili su širokog raspona, a radi se o izrazito varijabilnim promjenama koje ovise o vanjskim čimbenicima, kao izravna posljedica uvjeta i kvalitete života.

Trošenje zglobova uglavnom se povezuje sa starenjem, iako jake entezopatije mogu nastajati i uslijed čestog fizičkog napora. Osteoartritis (osteoartroza ili degenerativna artroza) je multifaktorna, degenerativna bolest nepoznate etiologije i patogeneze u kojoj dolazi do razaranja i gubitka hrskavice u zglobovima, sekundarnih promjena u okolnoj kosti i poremećaja u pokretljivosti (Damjanov i sur., 2011). Dijeli se na primarni i sekundarni; primarni je idiopatski te učestalost raste sa starenjem, dok se sekundarni pojavljuje kad je riječ o bolesti ili mehaničkom oštećenju. Osteoartritične promjene vidljive su na pravim (sinovijalnim) zglobovima unutar kojih se nalazi zglobna hrskavica u kojoj se tijekom života

reducira sadržaj proteoglikana i vode pa se gubi elastičnost (Damjanov i sur., 2011). S vremenom, hrskavica postaje grublje površine, mrežolika s napuklinama koje je čine mekom te dolazi do suženja zglobnog prostora (Potočki, 2005). Osim eburnizacije i sklerozacije subhondralne kosti (zgušnjavanje koštanog dijela ispod oštećene hrskavice) promjena uzrokovana osteoartritisom je i erozija kosti koja je, za razliku od reumatidnog artritisa, smještena centralno, a ne rubno (Potočki, 2005). Pojavljuju se i osteofiti koji uzrokuju podražaj u vezivu oko zgloba. Degenerativne promjene najjače zahvaćaju noseće zglobove, kao što su kukovi, koljena, lumbalna i cervikalna kralježnica, a mogu zahvatiti i interfalangealne zglobove prstiju ruke s karakterističnim Heberdenovim čvorićima kod žena (Damjanov i sur., 2011) te mjestu vezivanja tetiva i ligamenata²⁴.

Osteoporoza je posljedica neuravnoteženog odnosa pregradnje kosti gdje razgradnja prevladava nad stvaranjem kosti (Junqueira, Carneiro, 2005) te dolazi do smanjenja koštane mase. Senilna osteoporoza svrstava se u skupinu primarne osteoporoze tipa II²⁵ koja se očituje istanjenjem koštanih gredica i kortikalne kosti (Damjanov i sur., 2011). Zahvaća proksimalni dio bedrene kosti i nadlaktične kosti (White, Folkens, 2005), kralješke, goljeničnu kost te zdjelične kosti (Damjanov i sur., 2011). Mantila Roosa i suradnici (2012) prikazali su istraživanje gubitka gustoće kosti (BMD) proksimalnog dijela nadlaktične kosti na uzorku 170 zdravih muškaraca, europskog podrijetla. Korištena je DXA metoda²⁶, a rezultati su prikazani kao linearna funkcija. Vidljiv je progresivan gubitak gustoće kostiju u dobi od 30 do 80 godina, s ukupnim gubitkom gustoće kosti od 26%.

Postmenopauzalna osteoporoza tipa I povezuje se sa povećanim gubitkom spužvaste (trabekularne) kosti te je češća kod žena. Riggs i suradnici (1982) proveli su istraživanje u kojem su uspoređivali promjene u gustoći kosti proksimalnog dijela bedrene kosti i kralježaka povezane sa senilnom i postmenopauzalnom osteoporozom na uzorku 205 zdravih volontera (123 žene i 82 muškarca, u dobi od 20 do 92 godine) i 31 pacijentu sa prijelomom kuka (26 žena i 5 muškaraca, prosječne dobi 78 godina). Rezultati su pokazali da zdrave žene u danom rasponu dobi gube 58% gustoće kosti na vratu bedrene kosti, 52% na intertrohanteričnom dijelu bedrene kosti i 42% na području lumbalnog dijela kralježnice. Kod zdravih muškaraca također je vidljiv gubitak gustoće kosti, ali za 30% manje od žena u područjima bedrene kosti i za 75% manje u području kralježnice. Standardna devijacija za uzorak 26 žena sa

²⁴ Buikstra i Ubelaker (1994) dali su standarde za svaki pojedinu promjenu uzrokovanu osteoartritisom.

²⁵ Primarna osteoporoza dijeli se na Tip I osteoporozu koja se pojavljuje uglavnom kod žena u dobi od 50 do 70 godina (naziva se još i postmenopauzalna osteoporoza) i na Tip II osteoporozu (senilna ili involucijska osteoporoza) (Damjanov i sur., 2011).

²⁶ Dual X-ray Absorptiometry = apsorpciometrija s pomoću x-zraka dviju različitih energija

prijelomom kuka iznosila je -0.31 na vratu bedrene kosti, -0,53 na intertrohanteričnom dijelu bedrene kosti i +0.24 na području lumbalnog dijela kralježnice. Rezultat za uzorak 5 muškaraca sa prijelomom kuka bio je gotovo isti. Analiziran je i dodatan uzorak od 27 žena, u dobi od 51 do 65 godina, sa netraumatskim prijelomom kralježaka te je standardna devijacija iznosila -1,92 za lumbalni dio kralježnice. Ovi nam rezultati upućuju da senilnu osteoporozu karakterizira proporcionalni gubitak gustoće kosti (i kortikalne i trabekularne), uključuje cjelokupnu populaciju žena i, u manjoj mjeri, muškaraca te je povezana sa lomovima kuka i kralježaka. Postmenopauzalna osteoporoza, s druge strane, zahvaća tek manji dio žena u ranom postmenopauzalnom periodu, karakterizira ju ekscesivni gubitak trabekularne kosti i povezana je uglavnom s lomovima kralježaka. Japanski istraživač Norimatsu je sa suradnicima (1989) također istraživao gustoću kosti na području kralježaka i proksimalnog dijela bedrene kosti žena u Japanu te je također došao do zaključka da se kod žena u postmenopauzalnom dobu brže gubi gustoća kosti nego kod muškaraca. Osim spolnih razlika, postoji i razlika među etničkim populacijama, gdje su pokazali da je gustoća kosti manja u japanskoj nego u američkoj (kontrolnoj) populaciji (Norimatsu i sur., 1989).

Također je važno razlikovati atrofiju kod osoba s invaliditetom od staračke osteoporoze. Kod potonje dolazi do moždinskog stanjivanja, ali područja hvatišta mišića zadržavaju oblik. Kod *atrofije zbog neaktivnosti*, dolazi do smanjenja mišićnih hvatišta i resorpcije kosti kroz cijeli korteks, uključujući subperiostalno područje (White, Folkens, 2005). Takata i Jasui (2001) istraživali su tkz. *disuse osteoporosis* povezanu sa mišićnom atrofijom na nadlaktičnoj kosti, kostima podlaktice (palčanoj i lakatnoj kosti) i kostima potkoljenice (lisnoj i goljeničnoj kosti). Koristili su DXA metodu, a rezultati su pokazali razliku u izmjerenoj gustoći kostiju zdravog i atrofiranog uda. Kod zdravih udova gustoća kosti bila je 0,719 cm², a kod atrofiranih udova 0,555 cm².

Zglob križne i crijevnih kosti (*articulus sacroiliaca*) obično srašta samo kod starijih muškaraca, no nekada se može pronaći i kod mlađih osoba kao početni simptom ankilozantnog spondilitisa i degenerativnog hipertrofičnog artritisa. Ankilozantni spondilitis (Marie-Strümpell-Bechterewljeva bolest) je kronična bolest koja uzrokuje destrukciju zglobne hrskavice, osifikaciju fibroznog prstena te fibroznju i koštanu ankilozu zgloba. Obično se razvija jaka kifoza, a kralješci se spajaju pretvarajući kralježnicu u jednu kost, a na rentgenskoj snimci vidljiv je karakterističan izgled bambusovog štapa (Damjanov i sur., 2011). Kod žena, spoj križne i crijevnih kostiju ne srašta, ali se na ligamentima mogu pojaviti okoštavanja i osteofiti koji mogu srasti.

Okoštavanje pojedinih hrskavičnih tkiva također se može pojaviti sa starenjem, a tu se uključuje držak i tijelo prsne kosti (*manubrium sterni*, *corpus sterni*), tiroidna i krikoidna hrskavica te hrskavice rebara.

Degenerativne promjene na zglobnim plošinama u suvremenim se populacijama pojavljuju nakon četrdesete godine, a u arheološkoj nakon trideset pete.

Izgled nepčane kosti i sraštanje palatinskih šavova (*sutura palatina mediana* i *sutura palatina transversa*) dodatni su indikatori za određivanje starosti. Od rođenja do osamnaeste godine, nepčana je kost razmjerno debela s neravnom i grubom površinom, a palatinski šavovi su otvoreni i dobro definirani. Od osamnaeste do pedesete, površna nepčane kosti se progresivno stanjuje, a palatinski šavovi postupno sraštau. Nakon pedesete su uglavnom nevidljivi.

Svi spomenuti dodatni skeletni indikatori dobi, kao što je već spomenuto, varijabilni su što se tiče dobnih raspona te bi se trebali analizirati uz druge indikatore, kada je to moguće.

3.4.6. Određivanje odrasle dobi pomoću dentalnog materijala

Procjena starosti odrasle jedinke pomoću denticije više se ne temelji na razvoju, već trošenju zuba. Na stopu i obrazac trošenja utječu faktori kao što je razvojni slijed zuba, morfologija zuba, veličina zuba, unutarnja struktura krune, angulacija zuba, uporaba zuba nevezana uz prehranu (kao oruđe), biomehanika žvakanja i prehrana (McKee, Molnar, 1988., Walker i sur., 1991). Lovejoy i suradnici (1985c) testirali su korelaciju između dobi i trošenja zuba te se korelacija pokazala visokom. S obzirom da starenje nije uvijek jedini razlog trošenja zuba (patologija ili, već spomenuto korištenje zuba kao oruđa, tvrda hrana), osteolozi bi trebali biti na oprezu kada koriste ovu korelaciju (Milner, Larsen, 1991).

Gustafson (1950) je razvio prvu, široko priznatu, tehniku za određivanje starosti iz jednog zuba. Zabilježeno je šest promjena povezanih sa starošću koje je vrednovao na skali od 0 do 3 – atricija (okluzalno trošenje), parodontitis (povlačenje zubnog mesa), razvoj sekundarnog dentina, taloženje cementa na korijenu, resorpcija vrha korijena te postupna prozirnost apikalnog dijela korijena. Neki od ovih dijelova vidljivi su isključivo u histološkom prerezu. Rezultati za svaki faktor sažeti su i uspoređeni sa regresijskom linijom ukupnih rezultata i poznatom dobi iz 41 uzorka zuba. Uzorci potječu iz švedske dentalne klinike. Iz nekoliko razloga, uključujući statističku pogrešku, interval pouzdanosti od 95% ($\pm 7,3$ godine) pokazao se nepreciznim (Klepinger, 2006).

Miles (1963) je prvi ustanovio skalu atricije temeljenu na razvoju denticije. Osnovne prepostavke ove tehnike su da prvi kutnjak izbije (i počinje se trošiti) šest godina prije izbijanja drugog kutnjaka (pod pretpostavkom da je izbio između šeste i dvanaeste godine). Kada se otprilike isti opseg trošenja nađe na trećem kutnjaku, može se procijeniti da je osoba stara $18 + 6 = 24$ godine. Miles u kasnijim radovima koristi 6, 6.5 i 7 godina između sljedećeg izbijanja kutnjaka. Ova metoda podcjenjuje dob pojedinaca iznad dobi od pedeset godina (Miles, 2001).

Maples i Rice (1979) unaprijedili su tehniku Gustafsona dodavši varijable temeljene na poziciji zubau čeljusti, podrijetlu i spolu. Najveći nedostatak tehnike bio je djelomično uništavanje zuba, odnosno izrada histoloških preparata. Jednostavniju i manje destruktivnu metodu za procjenu starosti u odrasloj dobi iz zuba s jednostrukim korijenom predložili su Lamendin i suradnici (1992). Koristili su samo dva kriterija koja su mjerena na labijalnoj površini korijena – parodontitis i prozirnost korijena zuba. Jednadžba koja je proizašla iz uzorka temeljenog na 306 zuba od 208 pojedinaca je sljedeća:

$$A = (0,18 \times P) + (0,42 \times T) + 25,53$$

pri čemu A označava dob (Age), P visinu spuštanja zubnog mesa (Periodontosis) $\times 100$ /visina korijena (Periodontosis), a T visina prozirnosti korijena od njegova vrha (Transparency hight) $\times 100$ /visinu korijena; visine su izražene u milimetrima (mm). Na kontrolnom uzorku od 39 individua, za individue od 40 do 80 godina standardna pogreška²⁷ u Lamendinovoj metodi ($8,9 \pm 2,2$ godine) bila je manje od pogreške u Gustafsonovoj tehnici ($14,2 \pm 3,4$ godine). Prema ovim rezultatima, Lamendinova metoda nije pogodna za procjenu dobi individua mlađih od četrdeset i starijih od osamdeset godina. Ova je metoda dala obećavajuće rezultate za procjenu „teških“ srednjih godina, ali ostaje pitanje njene generalne primjenjivosti u forenzičnom kontekstu (Klepinger, 2006).

Prince i Ubelaker (2002) testirali su Lamendinovu tehniku na Terryjevoj kolekciji koja se nalazila u Institutu Smithsonian (Prirodoslovni muzej)²⁸. Analizirali su 400 zuba 94 ženskih jedinki afričke populacije, 72 ženske jedine europske populacije, 98 muških jedinki afričke populacije i 94 muških jedinki europske populacije. Iako je tehnika ponovno pokazala dobre rezultate za skupinu srednjih godina (u ovom slučaju od 30 do 70), Prince i Ubelaker predložili su modificiranu jednadžbu u kojoj su zasebno analizirali spol i grupu predaka.

²⁷ prosječna razlika između procijenjene i stvarne dobi.

²⁸ Museum of Natural History.

U novoj verziji RH predstavlja visinu korijena (Root hight), a ostali su termini ostali kao i u originalnoj Lamendinovoj tehnici. Jednadžba glasi:

Za muškarce afričke populacije: $A = 1,04 (RH) + 0,31 (P) + 0,47 (T) + 1,70$ (srednja pogreška bila je 6,24 godine sa standardnom devijacijom 4,97);

Za muškarce europske populacije: $A = 0,15 (RH) + 0,29 (P) + 0,39 (T) + 23,17$ (srednja pogreška bila je 7,25 godina sa standardnom devijacijom 5,93 godine);

Za žene afričke populacije: $A = 1,63 (RH) + 0,48 (P) + 0,48 (T) - 8,41$ (srednja pogreška bila je 9,19 godina sa standardnom devijacijom 7,17 godina);

Za žene europske populacije: $A = 1,0 (RH) + 0,31 (P) + 0,39 (T) + 11,82$ (srednja pogreška bila je 8,11 godina sa standardnom devijacijom 6,22 godine).

Prijedlog autora je bio da se spol i porijeklo odrede prije procjene dobi te da se nova jednadžba koristi kad god je moguće (problem bi nastao kada se dva navedena faktora ne mogu sa sigurnošću odrediti).

Ova prerada Lamendinove tehnike nije destruktivna, relativno je jednostavna i mjerenje ne zahtijeva posebnu opremu, a razina pozdanosti je usporediva ili bolja od drugih metoda procjene starosti odraslih osoba (Klepinger, 2006).

Treba uzeti u obzir da individue u Terryjevoj kolekciji nisu oličje odlične oralno-dentalne higijne te da bi loša higijena mogla ubrzati razvoj parodontitisa. Ova metoda danas ne bi bila primjenjiva u slučaju čestog korištenja metamfetamina, kada posljedično osoba ima tkz. *meth usta* (Klepinger, 2006).

Lovejoy (1985d) analizirao je prapovijesnu populaciju, tkz. uzorak Libben (srednjezapadno područje Sjedinjenih Američkih Država) te donio zaključak da je dentalna abrazija procijenjena serijacijom važan i pouzdan indikator procjene starosti u trenutku smrti. Utvrdio je da je na populacijskoj razini, potrošnja pravilna u formi i stopi. Navodi da procjena jedne jedinice u forenzičnom okruženju temeljena na dentalnoj potrošnji dopušta samo grubu procjenu dobi, ali ako se istražuje cijelu biološku populaciju, potrošnja zuba može donijeti precizne rezultate. Sa suradnicima (1985a) je zaključio da je dentalna potrošnja najbolji

pojedinačni indikator starosti u trenutku smrti u skeletnim populacijama te da na njega nema vanjskih utjecaja²⁹.

Kroz radove znanstvenika, predlagale su se i druge metode ili se raspravljalo o korelaciji dobi i denticije. Hilson (1986) i Whittaker (2000) osvrnuli su se na metode temeljene na mikroskopskoj analizi trajnih zuba te su pokazali da oblik sekundarne denticije smanjuje visinu korijena pulpne šupljine, dok su druga istraživanja pokazala da apikalna prozirnost korijena zuba korelira sa odraslom dobi, iako se ta tehnika pokazala manje korisnom (Kvaal i sur., 1994).

Drusini je sa suradnicima (1997) analizirao korelaciju indeksa pulpne šupljine krune zuba sa dobi na uzorku 846 netaknutih zuba od 433 indivude poznatog spola i dobi. Korištena je panoramska (rotacijska) radiografija kako bi se izmjerila visina krune (CH = coronal height) i visina pulpne šupljine krune zuba (CPCH = coronal pulp cavity height) 425 prekutnjaka od 213 muškaraca i 220 žena. Korišten je TCI (tooth-coronal index; Ikeda i sur., 1985) za svaki zub i primijenjen je na stvarnu dob. Korelacijski koeficijenti imali su raspon od -0,92 (kutnjaci, kombinirani uzorak, desna strana) do -0,87 (ženski kutnjaci) sa standardnom pogreškom $5,88 \pm 6,66$ godina. Korelacije su bile malo više kod muškaraca. Dobivena jednadžba dopuštala je procjenu starosti na uzorku od 100 pojedinaca oba spola (nije korištena za regresiju) sa standardnom pogreškom ± 5 godina u 81,4% slučajeva. Regresijska formula za procjenu dobi dobivena iz modernog uzorka testirana je na povijesnom uzorku od 100 zuba na stogodišnjim kosturima sa standardnom pogreškom ± 5 godina na 70,37% muškog uzorka (kutnjaci). Ova, malo poznata, metoda je pokazala da može imati vrijednost kod procjenjivanja dobi i kod živućih i skeletnih uzoraka nepoznate dobi.

²⁹ Na povijesnoj skeletnoj populaciji iz Nizozemske, isto je potvrdio i Mays (2002).

4. EKSPERIMENTALNE METODE

U sljedećim ćemo se poglavljima osvrnuti na eksperimentalne metode određivanja starosti. One uključuju mikroskopske, odnosno histomorfometrijske metode, racemizaciju aminokiselina, multifaktorske metode određivanja doživljene starosti te metilaciju DNA. Spomenute se metode mogu primjenjivati neovisno o dobnoj skupini pojedinaca, što im (u teoriji) daje prednost pred makromorfometrijskim metodama. Unatoč tome, još su potrebna daljnja istraživanja i dodatne provjere kako bi se ovakve metode mogle primjenjivati bez standardnih metoda.

4.1. Histološke metode odredbe doživljene starosti na koštanom materijalu

Histološke metode odredbe doživljene starosti se već stoljeće koristi za procjenu starosti u trenutku smrti. Prvo izvješće je objavljeno 1911. godine, a napisali su ga Balthazard i Lebrun. Njihova je procjena starosti modernih, povijesnih i prapovijesnih populacija pokazala obećavajuće rezultate za buduća istraživanja (Robling, Stout, 2008).

Amprino i Bairati (1936) i Jowsey (1960) među prvima su ukazali na mikroskopske promjene uslijed starenja koje su vidljive u mikrostrukтури korteksa dugih kostiju. Upravo je njihov rad bio polazište za stvaranje niza eksperimentalnih metoda koje su dale i prve konkretne rezultate (Kerley, 1965:149).

Koštani metabolizam počiva na dvije vrste stanica koja su neprekidno aktivne, osteoklasta koji su odgovorni za pregradnju te osteoblasta i srodnih stanica koje stvaraju kost. Metode procjene doživljene starosti histološkim metodama prikladne su isključivo za odrasle osobe, stoga će najzanimljiviji proces biti razgradnja kosti (Stout, 1998:237).

Pionirskom histološkom pristupa određivanja starosti ljudskih kostiju smatra se Ellis Kerley. U njenom originalnom radu (1965) možemo pronaći opis promjena u mikroskopskim strukturama kortikalne kosti od dvadesetih godina do starije dobi. Kako bi kvantificirala mikroskopske promjene i ustanovila sistem procjene dobi, napravila je 126 poprečnih presjeka središnjeg dijela dijafize dugih kostiju (*femur*, *tibia*, *fibula*). Četiri elementa su pokazala povezanost sa starošću: broj osteona, broj fragmenata osteona, količina lamelarne kosti i broj kanala koji nisu u tipu Haversovih kanala. Ti su segmenti analizirani pod svjetlosnim mikroskopom. Zbog veličine, svaki je uzorak rezan u još četiri manja koji

predstavljaju položaj na kosti – anteriorno, posteriorno, lateralno i medijalno – te su postavljena do vanjskog ruba kosti (uključujući i vanjski rub kosti). Unutar svakog od četiri područja, broj osteona, broj fragmenata i broj kanala koji nisu u tipu Haversovih kanala je pobrojan, a procijenjen je postotak polja kojeg čini periferna lamelarna kost. Svaka od tih sumarnih vrijednosti nije bila u skladu sa procijenjenom starosti u trenutku smrti. Zbog stalne pregradnje strukture črste tvari kosti, stara kost (osteon i periferna lamela) djelomično propada i zamjenjuje se novim osteonima u ponešto promjenjenoj poziciji. Sa starenjem, broj osteona i fragmenata raste, a periferna lamela brzo se pojavljuje, ali stopa taloženja se značajno smanjuje u odraslom dobu. Broj kanala koji nisu u tipu Haversovih kanala nadenih u perifernoj kosti također pada sa starenjem i na kraju nestaju do pedeset pete godine (Kerley, 1965).

Regresijsku formulu su modificirali Kerley i Ubelaker (1978) te su uspjeli smanjiti standardnu devijaciju sa 14,62 godine za fibularne kanale koji nisu u tipu Haversovih kanala na 3,66 godine za fragmente fibularnih osteona. Iako bi prema tome, fibularni fragmenti bili očiti izbor, postoje situacije u kojima oni nisu prisutni. U tom slučaju, drugi izbor predstavljaju femoralni fragmenti (6,98 godina), fibularni osteoni (8,33 godina), tibijalni fragmenti (8,42 godina) i femoralni osteoni (9,19 godina).

Walker i Lovejoy (1985) istraživali su promjene u spužvastoj i kortikalnoj strukturi kosti na makroskopskoj i mikroskopskoj razini, koristeći radiografske podatke iz Hamann-Toddove kolekcije i prapovijesne Libben kolekcije. Koristeći serijaciju, ovi su autori opisali progresivno gubljenje kosti starenjem značajno za određeno mjesto na ključnoj kosti i natkoljeničnoj kosti. Vizualna serijacija radiografskih podataka pokazala je umjereno visoku i značajnu korelaciju između starenja i smanjene gustoće kostiju, dok su Macchiarelli i Bondioli (1994) pokazali značajnu varijaciju u gustoći kostiju, ali nepovezanu sa starošću.

Stout (1986) te Cho i suradnici (2002) proširili su mikroskopsku analizu na poprečni presjek rebara, što se u nekim okolnostima može pokazati korisnim.

Sve su ove metode kvantitativne i ovise o pregradnji osteona te stvaranju novih. Iako postoje opće pretpostavke da ne postoje intrinzični i ekstrinzični faktori koji značajno ometaju proces koštane pregradnje (Stout, 1998:243), neki su ipak poznati: trauma i fraktura kosti, biomehanika (korištenje i atrofija), prehrana, lijekovi i metaboličke tvari (estrogen, alkohol, antikonvulzivi, kortikosteroidi) te patološka stanja (starosna i postmenopauzalna osteoporoza, rahitis, bolest krhkih kostiju, sekundarni hiperparatireoidizam, dijabetes melitus i Pagetova bolest) (Stout, 1998:240, Kerley, 1965:162). Unatoč njihovoj brojnosti, navedeni faktori moraju biti dugotrajni kako bi ostavili traga na čvrstom koštanom tkivu (Stout,

1998:243). Kako ne bi došlo do pogrešne procjene, potrebno je uzimati samo uzorke bez vidljivih patoloških stanja koji mogu utjecati na krajnji rezultat – neki od vidljivih indikatora ubrzanog ili patološke pregradnje su priusutnost primarnog lamelarnog tkiva kod odraslih osoba, tanke stijenke čvrstog tkiva i visoki broj resorptivnih otočića (Stout, 1998:244-245).

U jednom trenutku se postiže kritičan broj osteona po jedinici površine kod kojeg svaki novomodelirani osteon briše trag postojanja starog osteona (Stout, 1998:246), zbog čega će starost biti podcjenjena. Zbog opisanog procesa, histološke metode gube svoju preciznost u starijoj dobi (Kerley, 1965:159).

Kerley (1965) ju je testirala na sjevernoameričkoj zbirci te nije pronašla značajne populacijske razlike, dok su Ericksen (1976), Thompson i Guinness-Hey (1981) utvrdili razliku u broju osteona po jedinici površine između izvornog Kerlyjevog uzorka i populacija Eksima, Arikara i Pueblo Indijanaca.

Aiello i Molleson (1993) pokazali su da proces pregradnje ne teče jednakom brzinom kod dva uzorka (Kerley i uzorak iz Spitafieldsa iz 18. i 19. stoljeća), zbog čega Kerlyjeva metoda podcjenjuje starost mlađih pojedinaca.

Paine i Brenton (2006) su testiranjem Stout-Paine metode³⁰ (1992) utvrdili utjecaj prehrane na proces remodeliranja, zbog čega je ova metoda ovisna i interpopulacijskim razlikama.

Metodu je nemoguće upotrijebiti ukoliko je struktura kosti uništena uslijed tafonomskih promjena (Meindl, Russel, 1998:387), a zbog moguće postmortalne mineralizacije materijala, u nekim slučajevima nije moguće koristiti svjetlosni mikroskop, već je prikladniji polarizacijski mikroskop ili mikroradiograf (Kerley, 1965:162).

Ova je metoda poprilično destruktivna, oduzima mnogo vremena te je potrebna specijalizirana oprema koja nije uvijek dostupna, zbog čega se rjeđe koristi u arheološkom kontekstu.

4.2. Racemizacija aminokiselina (AAR)

Glavna biološka zadaća aminokiselina je izgradnja bjelančevina, a svaka aminokiselina se u početku sastoji od dva enantiomera (međusobno zrcalnih oblika): D i L. Sve aminokiseline najprije se nalaze u L obliku, da bi se starenjem pretvorile u D oblik, što predstavlja proces racemizacije.

³⁰ Modifikacija Kerlyjeve metode, ali na drugim kostima – rebra i ključne kosti.

Istraživanja su pokazala kako bi proporcije D i L enantiomera aspartične kiseline u dentinu uz stvaranje kalibracijske krivulje mogle služiti pri procjeni starosti u trenutku smrti (White, 2000:447). Prva su istraživanja bila izvedena na ograničenom uzorku te su pokazivala odstupanja i do ± 15 godina od stvarne starosti.

Ogino, Ogino i Nagy (1985) odvojili su dentin iz uzorka 61 žive osobe u dobi od 17 do 74 godine. Analizirali su različite zube, a rezultati nisu pokazali preklapanje sa stvarnom dobi što su pripisali različitom vremenu razvoja. Korigirali su analizu s pretpostavkom da se vrijeme završetka rasta krune zuba poklapa sa završetkom razvoja koronalnog dentina. Dobi navedene za potpuno izraslu krunu izvedene su iz originalne tablice Shoura i Masslera te su korištene kao faktori korekcije pri procjeni starosti zuba racemizacijom. Rezultati su pokazali da se regresijska linija dobivena iz svih tipova zuba može uspješno koristiti pri procjeni starosti sa standardnom pogreškom od 4 godine. Prednost ove metode je ta što se može primijeniti na zube s vidljivom lezijom uzrokovanom napredovanjem karijesa, ukoliko je očuvan dio zdravog dentina u kruni. Rezultati su još pozdaniji ukoliko se razmatraju zubi istog tipa – takvi su zubi najvjerojatnije kemijski i strukturalno sličniji (Ogino, Ogino, Nagy, 1985:262-264).

4.3. Multifaktorske metode određivanja starosti

Još je Todd (1920) u svom originalnom radu naglasio važnost korištenja višestrukih pokazatelja starosti na što više anatomskih elemenata kostura. Ponekad, uslijed veće fragmentiranosti ili nedostatku određenih elemenata kostura to nije moguće. Unatoč tome što se osteolozi najčešće slažu u pogledu korištenja višestrukih kriterija za određivanje starosti, mišljenja im se često razlikuju kod izbora korištenih tehnika.

Već smo spomenuli Gustafsona (1950) koji je koristio šest elemenata na longitudinalnom presjeku zuba (vidi poglavlje 3.4.6.).

Acsádi i Nemskéri (1970) objavili su metodu koja se temeljila na promjenama koje nastaju starenjem na preponskom spojištu, lubanjskim šavovima te propadanja trabekularne arhitekture epifize i prve trećine dijafize natkoljениčne i nadlaktične kosti (Acsádi, Nemskéri, 1970:122-135). Svakom se elementu pripisala faza te odredila srednja apsolutna vrijednost kao krajnji rezultat.

Lovejoy i suradnici (1985a) objavili su multifaktorsku metodu sumarne starosti koja se temelji na analizi komponenata. Ova je metoda uključivala promjene na površini preponskog spojišta, uškastoj površini crijevne kosti, trabekularnu arhitekturu proksimalnog dijela

natkoljениčne kosti te atriciju zuba, a starost se procjenjivala serijacijom. Nakon serijacije, izrađivala se interkorelacijska matrica te se provela kroz analizu komponenata. Prvi faktor je pretpostavljena stvarna kronološka starost koja se zatim uspoređuje sa svakim pojedinim indikatorom. Krajnji je rezultat aritmetička sredina svih indikatora koji je pokazao da je multifaktorska metoda preciznija od bilo kojeg indikatora zasebno (Lovejoy i sur., 1985a:4). U istom je radu testirana metoda te je pokazala da podcjenjuje starost starijih osoba.

Brooks i Suchey (1990) kritizirali su korištenje aritmetičke sredine, smatrajući ju metodološki neprikladnim, odnosno razlogom za sustavne greške i nepreciznost u promjeni. Pokazali su da metoda precjenjuje starost za osobe mlađe od 40 godina, a podcjenjuje za one iznad 70 godina (Kemkes-Grottenhaler, 2002:60).

Lamendin i suradnici (1992) predložili su jednostavniju metodu u kojoj se promatraju dva obilježja zuba s jednostrukim korijenom na labijalnoj površini – periodontitis i prozirnost zubnog korijena (jednadžbe vidi u poglavlju **3.4.6.**).

Bedford i suradnici (1993) testirali su multifaktorsku metodu slijepim testom iz skeletnog uzorka iz zbirke Grant. Uključila je koštane ostatke pedeset pet osoba poznate dobi sa ovjerenim smrtnim listovima. Trojica autora (Lovejoy, Bedford i Russel) bili upoznati s podacima sa smrtnih listova te su neovisno obavili serijaciju i odredili starost promatrajući promjene na četiri anatomska elementa: promjene na uškastoj površini crijevne kosti, preponskom spojištu te radiografiju proksimalnog dijela bedrene i ključne kosti. Sumarne starosti su tada izračunate za svakog pojedinca iz uzorka, a procjene su pokazale visoku korelaciju. Procjene multifaktorske procjene pokazale su veću povezanost sa stvarnom starošću od rezultata procjene bilo kojeg od navedenih faktora pojedinačno. Srednja pogreška (prosječno 8,7 godina) sumarne starosti bila je u prosjeku za jednu godinu manja od starosti individualnih faktora. Ovi rezultati ukazuju na to da korištenje višestrukih starosnih indikatora visoke pouzdanost, pomaže pri kontroli varijacije koje se događaju tijekom procesa starenja, bez obzira na tip indikatora.

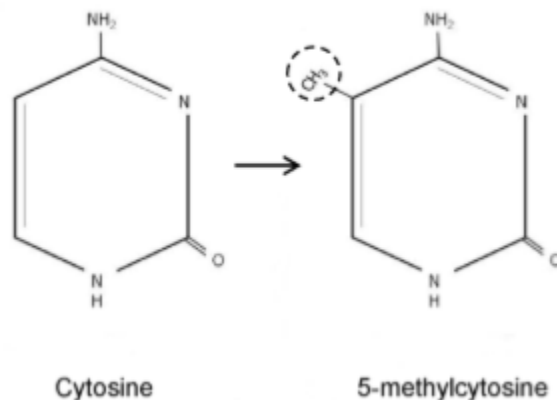
Boldsen i suradnici (2002) objavili su metodu pod nazivom analiza tranzicije u kojoj se modificira broj korištenih pokazatelja te je primjenjiva na pojedince ili mali populacijski uzorak. Ova analiza pretpostavlja da svaki pojedinac varijabilnim tempom prelazi iz jedne morfološke faze u drugu i da su te faze linearne. Ova analiza je pogodna za uzorke starije dobi, kada je smanjena preciznost procjene starosti.

Milner i Boldsen (2012) objavili su rad u kojem su koristeći analizu tranzicije procjenjivali dob 252 individue poznate starosti modernih američkih muškaraca i žena iz Bass-kolekcije i forenzičkih slučajeva iz Mercyhursta. Najbolje su rezultate dobili iz analize

površine preponskog spojišta, spoja križne kosti i crijevnih kostiju te lubanjskih šavova. Rezultati analize tranzicije nisu bili precizni poput rezultata makromorfoloških metoda, što ukazuje da je prevelika pozornost posvećena zdjeličnim i lubanjskim elementima.

4.4. Određivanje starosti pomoću DNA analize – metilacija DNA

Metilacija genomske DNA izrazito je važna epigenetička modifikacija kod eukariota te ima važnu ulogu u određivanju regulacije gena. Promjene u metilaciji DNA često se povezuju s bolestima kao što je dijabetes, shizofrenija, multipla skleroza i rak (Feng, Fan, 2009, Wilson i sur., 2007). Metilacija DNA predstavlja kovalentnu adiciju metilne skupine na citozinski prsten u citozin-gvanin dinukleotidnom kompleksu (CpG), čime se citozin pretvara u 5-metilcitozin (5mC) odnosno novu, petu bazu (Lister & Ecker 2009a). Proces *de novo* metilacije DNA se odvija pod utjecajem DNA metiltransferaza (*DNA methyltransferase - DNMT*), skupine enzima koje modificiraju CpG lokuse dodavajući metilnu skupinu (CH_3) s S-adenozil-L-metionina (SAM) na peti ugljikov atom nukleotida citozina, pri čemu se SAM konvertira u SAH (S-adenozil-L-homocistein).



Slika 15. Proces metilacije DNA – dodavanje metilne skupine na peti ugljikov atom nukleotida citozina. Izvor: Vidaki i sur. (2013:500).

Obrasce metilacije DNA uspostavljaju enzimi DNMT3A i DNMT3B uz prisustvo DNMT3L te se održavaju pomoću enzima DNMT1 i povezanih proteina (Lee, 2016). DNA hipometilacija³¹ povezana sa starenjem često se proučavala na različitim vrstama, ali novije su

³¹Hipometilacija je povezana s aktivnošću gena (promotorske regije, aktivni geni, “housekeeping” geni) (<http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/pogl17.html>), dostupno: 11. prosinca 2017. godine

studije pokazale da je velik broj CpG lokusa pod utjecajem hipermetilacije³² povezano sa starenjem (Horvath, 2013). Studije su također pokazale da se hipermetilacija povezana sa starenjem uglavnom odvija na CpG otocima³³ (Horvath, 2013). Ti se otoci nalaze u promotorskim regijama u više od 50% gena na koje otpada tek 1% ukupnog genoma (Jones, Liang, 2009). Regulacijska uloga ekspresije gena postiže se metilacijom unutar i na rubovima CpG otoka (Irizarry i sur., 2009). Hernandez i suradnici (2011) analizirali su metilaciju DNA na 27 000 CpG lokusa u ljudskom genomu, čeonom i sljepoočnom režnju te malom mozgu (*cerebellum*) 387 donora u dobi od 1 do 102 godine. Identificirali su CpG lokuse koji su pokazali visoku i konstantnu korelaciju između metilacije DNA i kronološke dobi. Većina tih lokusa nalazi se unutar CpG otoka. Također su pokazali da se CpG lokusi, gdje je metilacija DNA značajno povezana sa dobi, nalaze fizički blizu genima uključenim u vezivanje DNA i regulaciju transkripcije, što ukazuje na mogućnost utjecaja specifičnih promjena vezanih uz metilaciju DNA na ekspresiju gena u ljudskom mozgu. Starenje uzrokuje promjene metilacije DNA pomoću dvije biološke pojave - epigenetičkog sata i epigenetičkog drifta. Pretpostavka je da imamo zajednički epigenetički sat u kojem se na određenim mjestima u genomu događaju promjene povezane sa starenjem (a dijelom ga reguliraju promjene u metilomu), dok epigenetički drift uzrokuje okolišne i slučajne, intraindividualne promjene (Jones i sur., 2015, Horvath, 2013, Hannum i sur., 2013).

4.4.1. Analiza svježih uzoraka

Jones i suradnici (2015) proveli su istraživanje o promjenama metilacije DNA povezanih sa starenjem. Pokazali su povećanje metilacije DNA nakon rođenja, relativnu stabilnost nakon prve godine života te postupan gubitak nakon doseganja odrasle dobi. S napretkom tehnologije, dolazilo se i do novih saznanja o metilaciji DNA, razvijale su se preciznije metode za određivanje starosti koje su koristile manje uzorke (3-5 CpG lokusa), čemu se teži u forenzičnim znanostima. Većina se istraživača fokusirala na istraživanje uzoraka krvi koja se često pronalazi na mjestima zločina, ali se sve više istražuje i metilacija DNA na različitim vrstama uzoraka (sjemena tekućina, slina, zubi), zbog šire uporabe³⁴.

³² Hipermetilacija je povezana sa supresijom aktivnosti gena („utišavanje gena“)

(<http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/pogl17.html>), dostupno: 11. prosinca 2017. godine

³³ Regije bogate CpG dinukleotidima koje se čine imunitetima na metilaciju (Ehrlich i sur., 1982).

³⁴ Detaljniji prikaz znanstvenika koji su ispitivali promjene metilacije DNA uzrokovane starenjem može se pronaći u Lee i sur. (2016:362).

Garagnani i suradnici (2012) su na uzorku krvi od 64 osobe različite dobi, koristeći *Illumina Infinium Human Methylation 450 BeadChip* tehnologiju, pokazali jaku korelaciju dobi i metilacije DNA na trima CpG lokusima (geni *ELOVL2*, *FHL2*, *PENK*) te su predložili gen *ELOVL2* kao jedan od najpreciznijih pokazatelja doživljene starosti (Spearmanov koeficijent korelacije iznosio je 0.92). Rezultati su potvrđeni na većem uzorku od 501 osobe u dobi od 9 do 99 godina, uključujući sedam uzoraka krvi iz pupčane vrpce.

Weidner i suradnici (2014) predložili su model temeljen na podacima dobivenih metodom pirosekvenciranja triju CpG lokusa lociranih na tri različite genomske regije (geni *ITGA2B*, *ASPA*, *PDE4C*). Korelacija je bila visoka, a apsolutna razlika između predviđene i kronološke dobi iznosila je 4,3 godine. Nakon dvije godine, isti je princip testirao na uzorku bukalnog brisa, ali je rezultat pokazao precjenjivanje dobi za 14,6 godina.

S obzirom da se u forenzičnim slučajevima često pronalazi izrazito mala količina uzoraka, model Zbieć-Piekarske i suradnika (2015) činio se obećavajućim, koristeći samo 2 CpG lokusa na genu *ELOVL2*. Korištena je metoda bisulfitne konverzije i pirosekvenciranja na uzorku krvi. Pogreška predviđanja je iznosila 6,85 godina, a srednja apsolutna devijacija (*Mean Absolut Deviation, M.A.D.*) od kronološke dobi iznosila je 5,03 godine. Kasnije su ipak razvili model koristeći pet CpG lokusa te je smanjena srednja apsolutna devijacija na 3,9 godina (Zbieć-Piekarska i sur., 2015).

Freire-Ardanas je sa suradnicima (2016) istraživala obrasce metilacije DNA na 177 CpG lokusa na uzorku 725 osoba europskog podrijetla u dobi od 18 do 107 godina. Uspostavili su novi model predviđanja starosti temeljen na multivarijantnoj regresijskoj analizis sedam CpG lokusa sa najvišom korelacijom vezanom uz dob - *ELOVL2*, *PDE4C*, *FHL2*, *ASPA*, *CCDC102B*, *C1orf132* i *chr16: 85395429*. Rezultati su pokazali značajno povećanje metilacije DNA kroz vrijeme na lokusima *ELOVL2*, *PDE4C* te *FHL2* i smanjenje metilacije DNA na lokusima *ASPA*, *CCDC102B*, *C1orf132* i *chr16: 85395429*. Srednja apsolutna devijacija iznosila je 3,1 godinu (Freire-Ardanas i sur., 2016).

Osim krvi, istraživani su i uzorci sjemene tekućine. Lee i suradnici (2015) istraživanje su proveli na trima CpG lokusima (geni *TTC7B*, *NOX4* te *cg12837463*), koristeći *Illumina's Infinium Human Methylation 450 BeadChip* tehnologiju i SNaPShot analizu. Pokazali su da postoji visoka korelacija između predviđene i kronološke dobi, sa srednjom apsolutnom devijacijom od otprilike 5 godina.

Bocklandt i suradnici (2011) su svoje istraživanje fokusirali na analizu uzroka sline, identificirajući tri CpG lokusa (geni *EDARADD*, *TOM1L1*, *NPTX2*). Koristeći *Illumina*

Infinium Human Methylation 27 BeadChip tehnologiju, sastavili su regresijski model koji je mogao predvidjeti dob pojedinca sa prosječnom preciznošću od 5,2 godine.

Giuliani i suradnici (2015) su iskoristili dotadašnja saznanja o metilaciji DNA iz uzoraka krvi, sjemene tekućine i sline te ih primjenili na novi model za predviđanje dobi analizirajući dentin, cement i pulpu zuba. Koristili su MALDI-TOF spektrometar mase kako bi analizirali razinu metilacije DNA iz uzorka od 21 zuba pojedinaca u dobi od 17 do 77 godina. Uzorci su pripadali modernim populacijama, a identificirani CpG lokusi nalazili su se na genima *ELOVL2*, *FHL2* i *PENK*. Analiza je pokazala različite rezultate, ovisno o tome iz kojeg se dijela zuba ekstrahira DNA:

- srednja apsolutna devijacija = 1,20 godina ($SD^{35} = 1,9$ godina) - DNA iz pulpe i cementa istog zuba
- srednja apsolutna devijacija = 2,25 godina ($SD = 2,25$ godina) - DNA isključivo iz pulpe
- srednja apsolutna devijacija = 2,45 godina ($SD = 3.3$ godine) - DNA isključivo iz cementa
- srednja apsolutna devijacija = 7,07 godina ($SD = 7,0$ godina) – DNA isključivo iz dentina

Horvath (2013) je razvio model određivanja starosti na višestrukim tkivima kako bi mogao procijeniti metilacijsku dob svih vrsta tkiva i tipova stanica. Taj je model razvijen na temelju 8000 uzoraka iz 82 Illumina baze podataka, a koristeći regresijski model elastične mreže (eng. *elastic net regression model*), izabrao je 353 markera metilacije. Dobivena je jaka korelacija između metilacije i kronološke dobi u širokom spektru tkiva i tipova stanica, posebno u heterogenim tkivima (krv, periferne mononuklearne stanice krvi, moždani uzorci, potiljačni režanj, crijeva, jetra, pluća, slina, vrat maternice), ali i u individualnim tipovima stanica kao što su CD4T stanice i CD14 monociti. Model predviđanja starosti je izrazito točan u bazama podataka koje sadržavaju podatke adolescenata i djece (krv, moždani podaci i bukalni epitel³⁶) (Horvat, 2013).

Metilacija DNA u manjoj je korelaciji sa dobi iz uzorka tkiva dojke, endometrije maternice³⁷, kožnih fibroblasta³⁸, koštano-mišićnih tkiva i srčanih tkiva. Postoje potencijalni biološki razlozi za povećanje pogreške kod procjene DNAm dobi, ali potrebna su daljnja

³⁵ Standardna devijacija

³⁶ Epitel je jedno od 4 osnovne vrste tkiva; bukalni epitel se nalazi na unutrašnjoj strani obraza.

³⁷ Sluznica maternice

³⁸ Vrsta stanice vezivnog tkiva

istraživanja (Horvath, 2013). Analiza 6 000 uzoraka zahvaćenih rakom iz 32 baze podataka pokazala je da svih 20 tipova raka značajno ubrzava starenje (u prosjeku 36 godina) (Horvath, 2013).

Kim i suradnici (2017) razvili su indeks deficita³⁹ pod nazivom FI₃₄ (Kim i sur., 2013) koji se sastoji od 34 zajedničkih zdravstvenih i funkcionalnih varijabli, a glavni mu je cilj određivanje biološke dobi u svrhu predviđanja smrtnosti. Ovaj indeks se povećava sa dobi, ukazujući na urušavanje zdravlja i sposobnosti funkcioniranja. Usporedili su metodu metilacije DNA i FI₃₄ koristeći Coxov regresijski model kojim se procjenjuje utjecaj nezavisnih varijabli (ili njihovih kombinacija) na smrtnost, odnosno preživljenje. Utvrđeno je da se metilacijom DNA bolje utvrđuje smrtnost na uzorcima u dobi od 60 do 103 godine, no kada je izdvojena populacija u dobnoj skupini od 90 do 99 godina, biološka dob i indeks deficita ipak su pokazali bolje rezultate (Kim i sur., 2017).

4.4.2. Ograničenja metode analize metilacije DNA

S obzirom da brzina i razmjer promjena vezanih uz dob varira među pojedincima u bilo kojoj danoj kronološkoj dobi (Mitnitski i sur., 2002), razvijen je pojam biološke (epigenetičke) dobi koji diferencira kronološku od biološke dobi. Heterogenost u biološkom starenju među kronološkim vršnjacima zahtijeva pouzdanu mjeru biološke dobi odvojene od kronološke dobi (Kim, 2017). Anomalije i bolesti, poput trisomije 21 i HIV-a, mogu ubrzati epigenetički sat (ili ga usporiti kao što je slučaj sa X-sindromom) čime se kronološka dob još odmiče od biološke. Na preciznost određivanja doživljene starosti mogu utjecati vanjski čimbenici (način prehrane, fizička aktivnost, pušenje i konzumacija alkohola modificiraju metilaciju DNA od samog začeća, tijekom kasnijeg života pa sve do smrti, što može dovesti do nepreciznih rezultata kod određivanja kronološke dobi), interpopulacijske razlike te problemi vezani uz same uzorke.

U vanjske čimbenike koji mogu utjecati na obrasce metilacije DNA ubrajamo način prehrane, fizičku aktivnost, konzumaciju alkohola i pušenje.

Istraživanja koja su se bavila utjecajem prehrane na metilaciju DNA analizirali su utjecaj nedostatka vitamina B12 na metilacijski potencijal (SAM/SAH). Korištena su ljudska adipozna tkiva te su istaknute su dvije promotorske regije (*SREBF1* i *LDLR*) koje su ključne za regulaciju biosinteze kolesterola. Analiza je pokazala hipometilaciju u spomenutim

³⁹ Frailty index

regijama, odnosno vidljivu akumulaciju kolesterola pod uvjetima smanjene razine vitamina B12 (Adaikalakoteswari i sur., 2015).

Osim nutrijenata, fizička aktivnost također se pokazala faktorom koji utječe na obrasce metilacije DNA, što može onemogućiti točnu procjenu doživljene starosti. Rezultati analiza su pokazali da kod akutnog vježbanja dolazi do hipometilacije DNA u određenim genima koštano-mišićnog tkiva, ali da obrasci ovise i o intenzitetu vježbe (Barrès i sur., 2012).

Konzumacija alkohola i cigareta često su istraživani faktori koji utječu na promjenu obrazaca metilacije DNA. Mnogobrojna istraživanja su pokazala hipometilirane regije DNA kod ovisnika o alkoholu i to sa značajnom metilacijskom razlikom od osoba koje ne konzumiraju alkohol. Slični su rezultati dobiveni i istraživanjima vezanim uz dim cigarete, gdje su također identificirane hipometilirane regije kod aktivnih pušača. Promjena obrasca metilacije DNA identificirana je i kod novorođenčadi koja je bila izložena dimu cigarete, ali je metilacijska razlika od neizložene novorođenčadi bila zanemariva. Važno je naglasiti da je u pojedinim istraživanjima iskazana razlika u razini hipometilacije među vrstama tkiva te su potrebna daljnja istraživanja kako bi se mogla preciznije odrediti doživljena starost. Kada se analiziraju dva spomenuta faktora, važno je napomenuti da su ovisnici o alkoholu često i aktivni pušači, što mora biti uključeno kao varijabla. Svi navedeni čimbenici mogu utjecati na preciznost procjene kronološke dobi, s obzirom da obrazac metilacije DNA, ukoliko je promijenjen, a istraživač nema informaciju o uzroku, može navesti na krive zaključke.

Većina dosadašnjih modela ispitivana je na populacijama europskog podrijetla. S vremenom se javila potreba za pronalaskom univerzalnih modela za određivanje doživljene starosti, neovisnih o biogeografskom statusu pojedinca ili prilagodba već postojećih. Studije su provedene na afričkim (Baka iz srednjoafričke prašume i ≠Khomani San iz južnoafričke Kalahari pustinje) i azijskim populacijama (Han Kinezi) kako bi se ustanovili obrasci koji se pojavljuju univerzalno u svim populacijama. Sva istraživanja su pokazala postojanje određenih CpG lokusa koji koreliraju sa doživljenom starošću, a mogu se primjenjivati neovisno o podrijetlu. Gen koji je povezan sa starenjem, a ističe se u svim studijama je *ELOVL2* i smatra se najboljim biomarkerom za određivanje doživljene starosti među genetički različitim populacijama. Osim gena *ELOVL2*, u nekoliko studija azijskih populacija spominju se još i lokusi *cg04208403 (ZNF423)* i *cg19283806 (CCDC102B)*⁴⁰, *ITGA2B* i *PDE4C*⁴¹ za koje već prije potvrđena jaka korelacija sa starošću.

⁴⁰ Park i suradnici (2016).

⁴¹ Xu i suradnici (2015).

Kod forenzičnih istraga, najveći problem na koji istražitelji nailaze je količina uzoraka koji pronalaze na mjestu zločina. Istraživanja koja se provode izvan forenzičnog miljea koriste minimalno 200ng molekule DNA, dok forenzični uzorak prosječno sadrži manje od 10ng molekule DNA (Parson i sur., 2017).

Analiza koštanih ostataka i zuba od iznimne je važnosti, s obzirom da skeletni ostaci predstavljaju najmanje zastupljeni izvor DNA za forenzične antropologe. Za ova tkiva postoji malo istraživanja te su potrebna daljnja kako bi se moglo procijeniti mogu li se modeli koji se koriste za moderne populacije koristiti i u povijesnim uzorcima. Analiza drevne DNA (aDNA) je zahtjevnija, zbog procesa deaminacije koji se prirodno događa od trenutka smrti – metilirani citozin se razgrađuje u timin dok nemetilirani citozic tijekom vremena prelazi u uracil u postmortalnim uzorcima (Hofreiter i sur., 2001).

Ubrzavanje ili usporavanje epigenetičkog sata na različitim CpG lokusima zbog evolucijske varijacije u ljudskoj prehrani ili okolišu moglo bi imati utjecaj na drevne i moderne populacije i njihove metilacijske obrasce (Freire-Aradas i sur., 2017). Unatoč ograničenjima, provedeno je istraživanje na 4000 godine starom uzorku kose Paleo-Eskima koji je pripadao Saqqaq kulturi. Analizirali su dva CpG lokusa (*TRIM58* i *KCNQ1DN*) iz izolirane DNA, a procijenjena starost bila je između 44,1 i 69,3 godine (Pedersen i sur., 2014). Smith je sa suradnicima (2015) istraživao aDNA citozin metilaciju (koristeći direktno bisulfatno sekvenciranje) na skeletnom uzorku 30 pojedinaca, pripadnika grupe američkih domorodaca, datiranom između 350 i 4500 godina prije sadašnjosti. Analiza je pokazala da se citozin metilacija može iščitati iz većine uzoraka te da je preciznost procjene citozin metilacije u direktnoj korelaciji sa kvalitetom očuvanosti uzorka. Ovo je istraživanje pokazalo da je moguće analizirati epigenetičke obrasce iz velikih uzoraka drevnih populacija, koristeći metodu direktnog bisulfatnog sekvenciranja.

Mrlje krvi također se često pronalaze u forenzičnim slučajevima te su neke studije potvrdile stabilnost metilacije DNA u takvim uzorcima, a Huang i sur. (2015) nisu našli statistički značajne razlike u predviđenoj dobi, neovisno radi li se cjelovitom uzorku krvi (svježi uzorak) ili samo mrlji (trag krvi, obično sasušena). Osim toga, Zbiec-Piekarska i suradnici (2015) ispitali su stare uzorke krvi koji su čuvani na sobnoj temperaturi 5, 10 i 15 godina. Iako se s vremenom koncentracija DNA progresivno smanjivala, uzorci koji se mogu amplificirati, davali su dosta precizne procjene dobi, neovisno o vremenu skladištenja, tako potvrđujući stabilnost obrazaca metilacije DNA.

Iz rezultata istraživanja koje su proveli Horvath (2013) i Lee sa suradnicima (2016) vidljivo je da je procjena epigenetičke dobi iz sjemene tekućine niža od drugih uzoraka te je

predložen poseban prediktor dobi za sjemenu tekućinu. S obzirom da sjemena tekućina sadrži spolne stanice, postoji mogućnost da epigenetički obrasci mogu biti održavani i drugačijim biološkim putevima nego kod somatskih stanica.

Bilo bi korisno imati univerzalni pokazatelj starosti koji bi se mogao simultano primijeniti na bilo koji uzorak u forenzičkim slučajevima. Zbog količine DNA koja je potrebna za provedbu Horvathovog modela za višestruka tkiva, nemoguće ga je iskoristiti u slučajevima kada je dostupna mala količina DNA ili je DNA degradirana (Freire-Aradas i sur., 2017).

4.4.3. Budućnost određivanja starosti ljudskih ostataka pomoću metilacije DNA

U određivanju starosti pojedinca, primjena znanja o metilaciji DNA bila je velik napredak u uporabi molekularnih metoda. Tehnologija napreduje, a modeli se usavršavaju. Dosadašnja istraživanja uglavnom su se temeljila na uzorcima krvi, ali s obzirom na potrebe forenzičnih stručnjaka koji na mjestima istrage pronalaze i druge vrste uzoraka (sline, sjemena tekućina, epitel) postoji potreba za osmišljavanjem novih modela za pojedinačnu vrstu uzorka ili prilagođavanje postojećih kako bi unificirali način analize. Kao što je navedeno u prijašnjim poglavljima, istraživanja takve vrste već postoje, a s obzirom na brzinu razvitka tehnologije i znanosti, možemo očekivati i sve preciznije rezultate. Također je važno razviti metode koje će omogućiti određivanje dobi iz tvrdih tkiva, konkretno zuba i kostiju. Giuliani i suradnici (2015) već su pokazali kako je moguće vrlo precizno odrediti dob osobe iz različitih slojeva zuba. Pitanje je vremena kada će se isto moći primijeniti i na koštane ostatke. Informacije o starosti osobe od presudne su važnosti u identifikaciji nestalih osoba, posebno u slučajevima kada meko tkivo nije dostupno. Brzina i efikasnost molekularnih metoda uvelike će pridonijeti rješavanju takvih slučajeva.

Osim što je važno izraditi nove modele u svrhu određivanja starosti, važno je i modificirati i proširiti postojeće na što veći broj različitih grupa, odnosno populacija. Većina se temelji na populacijama europskog podrijetla, što smanjuje mogućnost preciznog određivanja dobi pomoću metilacije DNA. Znanstvenici su već prepoznali potrebu te se provode istraživanja koja donose obećavajuće rezultate. Svaki identificirani CpG lokus na kojem se odvija metilacija povezana sa dob može nam dati novi uvid u populacijske razlike ili sličnosti koje kasnije možemo iskoristiti u forenzične i medicinske svrhe.

Način života nas također određuje i zbog toga se razvijaju modeli koji će prema metilacijskom obrascu prepoznati određena obilježja. Pušenje, alkohol, hrana i fizička aktivnost faktori su za koje se pokazalo da mogu utjecati na metilaciju DNA, a daljnje istraživanje istih će pridonijeti preciznijem određivanju doživljene starosti pomoću metilacije, odnosno lakšem prepoznavanju anomalija uzrokovanih spomenutim navikama.

Sve navedeno ovisi o količini pronađenog uzorka. Istraživanja provedena u forenzičnim i medicinskim institucijama imaju pristup većoj količini DNA te su istraživanja lakše provediva. U slučaju forenzičnog slučaja, uzorak može biti izrazito malen, a tako i količina iskoristive DNA može biti ograničena. Sva istraživanja stoga teže dobivanju maksimalne količine informacija iz minimalno dostupnog uzorka. Kada je u pitanju uzorak krvi, postoji napredak te je moguće odrediti dob osobe već samo iz mrlje krvi. Broj CpG lokusa potrebnih za određivanje dobi također je drastično smanjen, ali zbog veće preciznosti istraživanja se provode na velikim uzorcima. Važno je na umu imati primjenjivost rezultata istraživanja na realnom slučaju, na čemu forenzični i medicinski stručnjaci i ustraju.

5. RASPRAVA

Određivanje doživljene starosti je u forenzičkim i antropološkim znanostima od iznimne važnosti. To dokazuje velik broj istraživanja i radova koji se bave promjenama tijekom razvoja i starenja. U praksi se upotrebljavaju standardne, makromorfološke metode koje su već dovoljno ustaljene i koje su pokazale zadovoljavajuće rezultate u modernom i arheološkom kontekstu. Metode određivanja doživljene starosti prikazane su u okvirima dobnih skupina – prenatalno i postnatalno doba, adolescencija i odrasla dob. S obzirom da ne postoji niti jedna standardna metoda koja se može univerzalno primijeniti na uzorke, neovisno o dobnoj skupini, znanstvenici su tijekom godina osmišljavali nove i prilagođavali postojeće metode. U određivanju prednatalne starosti još uvijek postoje pitanja na koja nije moguće u potpunosti točno odgovoriti, kao što je točan datum oplodnje i inseminacije, ali i vremenski raspon među njima⁴² koji može biti varijabilan i na taj način utjecati na preciznost određivanja fetalne starosti. Osim oplodnje i inseminacije, znanstvenici su se fokusirali na morfološki razvoj koji može varirati među pojedincima. S obzirom na sve probleme vezane uz procjenu fetalne starosti, razvijene su tehnike koje se odnose na pojavu, morfologiju i sraštavanje osifikacijskih centara kao pokazatelja fetalne starosti. U začecima je za prikaz kostiju fetusa korištena anatomska disekcija, ali s vremenom su metode napredovale. Tri su osnovne metode koje se koriste za prikaz pojave osifikacijskih centara, a svaka od njih ima svojih nedostataka. Histološka metoda je komplicirana te prikazuje raniju pojavu osifikacijskih centara, čišćenje uzorka kalij-hidroksidom i bojanje alizarinom uništava meko tkivo te je primjenjiva samo u ranom stadiju⁴³, a u radiološkim analizama tkivo je rendgenski vidljivo kasnije nego kod drugih metoda. Usporedbom triju tehnika, pokazane su određene razlike u procjeni fetalne starosti, zbog čega su i danas upitne⁴⁴. Kad je u pitanju morfologija osifikacijskih centara, istraživanja su pokazala jaku korelaciju između fetalne dobi i dužine kostiju⁴⁵, ali su istraživanja napravljena na uzorcima abortiranih fetusa, što je moglo dovesti do određenih anomalija u rezultatima. Zbog štetnog utjecaja, standardne radiografske metode ne mogu se koristiti na živućim fetusima, a istraživanja ultrazvukom još uvijek nije dovoljno kako bi se podaci mogli iskoristiti u svrhu procjene fetalne starosti. Većina kosti sraste postnatalno, zbog čega se znanstvenici nisu posebno fokusirali na element sraštavanja

⁴² Scheuer i Black (2000).

⁴³ O'Rahilly i Gardner (1972).

⁴⁴ Meyer i O'Rahilly (1958).

⁴⁵ Fazekas i Kósa (1978).

osifikacijskih centara. Dentalna starost se određivala već spomenutim tehnikama i iako razvoj počinje već u prenatalnoj dobi, distinktivne značajke su vidljive tek postnatalno. Sve korištene metode ne mogu s velikom preciznošću odrediti fetalnu starost, a nedostatak istraživanja na živućim fetusima onemogućava napredak spomenutih metoda. UZV bi se mogao razmotriti kao dobra metoda za analizu živućih fetusa, s obzirom da nije destruktivna i nema štetnih posljedica za plod.

Pri određivanju doživljene starosti mladih osoba (od postnatalne dobi do adolescencije), glavna je prepreka rijetkost dostupnih uzoraka. Kada je u pitanju forenzički kontekst, emocionalna trauma kod roditelja onemogućava daljnja istraživanja, a u arheološkom kontekstu novorođenčad, zbog teških životnih uvjeta u prošlosti, često ni ne doživljava adolescenciju. Iz navedenih razloga, metode određivanja doživljene starosti koriste se uglavnom u kliničkom kontekstu. Pojava osifikacijskih centara dugih kostiju analizirala se radiografskim metodama u svrhu predviđanja visine u odrasloj dobi⁴⁶. Korištena metoda nije analizirala poredak razvoja pojedinih koštanih elemenata, već cjelokupno sazrijevanje, za razliku od atlas-tehnike. Iako je takva metoda bila preciznija, zahtijevala je više vremena. Mnoga su se istraživanja bavila spomenutom problematikom, ali isključivo na djeci europskog podrijetla, a u obzir nisu uzete ni postojeće okolišne varijacije, što onemogućava univerzalu uporabu⁴⁷. S obzirom da se tijekom godina nisu razvile nove tehnike i nisu moguća nova longitudinalna istraživanja (zbog štetnosti radiografskog snimanja), nije moguća ni nadogradnja baza podataka o trendu povećanja rasta, stoga postojeće tablice vrijednosti treba prilagoditi. Pri određivanju doživljene starosti pomoću sraštanja osifikacijskih centara i epifiza, standardne metode su već ustaljene i poprilično precizne. Korištene su radiografske metode pomoću kojih je vidljiv proces sraštanja osifikacijskih centara. Sraštanje epifiza smatra se jednim od najboljih pokazatelja starosti, zbog toga što su tragovi sraštanja vidljivi i pet godina nakon završetka procesa⁴⁸. U ovoj fazi skeletnog razvoja, za određivanje doživljene starosti koristi se više anatomskih elemenata i starost je određena s većom preciznošću. Metode su ustaljene i iako postoje određene varijacije u rezultatima, preciznost je dostatna. Tanner-Whitehouse 2 metoda opisuje varijacije u sazrijevanju pojedinih koštanih elemenata te uključuje spol kao važnu distinktivnu komponentu, što potvrđuje i RUS metoda⁴⁹. Nekoliko se glavnih problema javlja kod određivanja starosti kod adolescenata -

⁴⁶ Tanner (1978).

⁴⁷ Klepinger (2006).

⁴⁸ Klepinger (2006).

⁴⁹ Tanner (1962,1975).

odredba spola, što je otežano u razdoblju prije adolescencije, sekundarni trend dječje pretilosti, sve ranije skeletno sazrijevanje i neprimjenjivost na različite etničke skupine.

Kada se doživljena starost određuje na uzorku odrasle osobe, važno je naglasiti da se više ne promatra rast i razvoj kostiju, već makromorfološke promjene povezane sa starenjem. Problem u procjeni starosti javlja se u identifikaciji uzroka promjena na kostima, s obzirom na to da one mogu biti uzrokovane i određenim bolestima. Znanstvenici su se orijentirali na analizu triju glavnih anatomskih elemenata – površinu preponskog spojišta, uškastu površinu crijevne kosti, sternalne krajeve rebara, a kao sekundarne metode koristila se analiza sraštanja šavova lubanje i palatinskih šavova, izgled nepčane kosti te degenerativne promjene. Što se tiče analize površine preponskog spojišta, napravljena su brojna istraživanja tijekom godina, a začetnik je bio Todd (1920) koji je prvi dao pregled morfoloških promjena, a tijekom godina je metoda revidirana i stvoren je usavršeni oblik⁵⁰ koji je davao preciznije rezultate, odnosio se na etnički raznolik uzorak i uključivao je oba spola. S obzirom na rijetkost pojave preponskog spojišta na nalazištima, prebacivanje fokusa na uškastu površinu crijevne kosti bilo je logično. Metode određivanja starosti pomoću spomenutog elementa još uvijek se analiziraju i preispituju kako bi se došlo do što preciznijih rezultata. Sternalni krajevi rebara analizirani su u svrhu određivanja starosti, ali su pokazali odstupanja u odnosu na rezultate analize preponskog spojišta i uškaste površine crijevne kosti. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se postigli zadovoljavajući rezultati. Ostali skeletni pokazatelji pokazali su manju preciznost pri određivanju doživljene starosti te se ne mogu uzimati u obzir samostalno. Metode koje su uključivale dentalne ostatke pokazale su se najpreciznijima. Prednost određivanja starosti pomoću dentalnih metoda svakako je očuvanost uzorka i česta pojava na nalazištima. Kod odraslih osoba, starost se procjenjuje na temelju trošenja zuba. Mnogobrojni su radovi proizašli iz istraživanja denticije te su izvedene metode koje su pokazale visoku korelaciju sa starošću. S obzirom da su histološke metode bile destruktivne, Lamendin i suradnici (1992) dali su jednadžbu pomoću koje se određivala starost pomoću dva faktora - parodontitis i prozirnost korijena zuba, ali je starost najbolje procjenjivala u srednjim godinama. Ova je tehnika kasnije testirana⁵¹ na različitim populacijama te na oba spola. U odnosu na prijašnje metode, revidirana metoda pokazala je zadovoljavajuće rezultate i dala standarde za određivanje doživljene starosti.

Standardne metode još uvijek su predmet mnogih istraživanja i postoji želja za daljnjim usavršavanjem. Izrazito su korisne kod identifikacija osobe (određivanje doživljene

⁵⁰ Suchey i Brooks (1990).

⁵¹ Prince i Ubelaker (2002).

starosti jedan je od glavnih elemenata identifikacije), posebice kada je potrebna brza i spretna reakcija, kao npr. kod identifikacije osoba stradalih u masovnim katastrofama. Dosad viđene metode su ustaljene i u praksi su se pokazale dovoljno preciznima. Unatoč tome, potrebna su daljnja istraživanja i analize kako bi se određene metode mogle primijeniti na etnički različite uzorke. Univerzalna upotreba metoda ono je čemu se teži u forenzičkim i antropološkim znanostima.

Eksperimentalne metode predstavljaju mogućnost određivanja doživljene starosti, neovisno o kojem se anatomskom elementu radi, kojoj dobnoj skupini pojedinac pripada ili kojeg je spola. Unatoč velikom broju istraživanja, histološke metode još uvijek nisu dovoljno usavršene kako bi se mogle samostalno koristiti u procjeni doživljene starosti. One u potpunosti ovise o pregradnji i stvaranju novih osteona. Na taj proces mogu utjecati razni čimbenici, kao što je prehrana, razne bolesti i uzimanje lijekova. Osim toga, Stout (1998) je pokazao da se može doseći kritičan broj osteona po jedinici te svaki novonastali osteon briše tragove starog osteona, što podcjenjuje starost. Jedan od nedostataka je svakako nemogućnost primjene metode na različite etničke populacije⁵². Histološke metode se još moraju istraživati i testirati kako bi bile korisne u forenzičkim i arheološkim slučajevima. Racemizacija aminokiselina u dentalnim ostacima pokazala se kao obećavajuća metoda za procjenu doživljene starosti. Ogino i suradnici (1985) dali su metodu prema kojoj je srednja pogreška pri procjeni starosti bila ± 4 godine, a mogla se primijeniti i na zubima zahvaćenim karijesom u čijoj se kruni sačuvao dio zdravog dentina. Prema daljnjim istraživanjima, ukoliko se istražuju zubi istog tipa, procjene bi mogle biti još preciznije. Ovakvi rezultati otvaraju put daljnjim istraživanjima racemizacije aminokiselina koja bi doprinjela razvitku eksperimentalnih metoda i dovela ih do razine standardnih. Multifaktorske metode zapravo se nadovezuju na makromorfološke metode, objedinjujući nekoliko pokazatelja u jednu metodu. Kroz različita istraživanja, testirane su korelacije između svakog pojedinog pokazatelja i multifaktorske metode. Tijekom godina su kombinirani različiti anatomske elementi, povećavala se preciznost, ali rezultati su pokazali da se standardnim metodama još uvijek bolje procjenjuje starost. Korištenje drugačijih kombinacija, razvijanje novih tehnika i metoda može dovesti do češće upotrebe multifaktorske metode, kada nam uzorak to dopušta.

Metilacija DNA jedan je od faktora koji najviše obećava među eksperimentalnim metodama. Razvojem genetike, a kasnije i epigenetike, otkrivanjem novih spoznaja o molekulama DNA, došlo je i do razvitka u području forenzičkih znanosti. Određivanje doživljene

⁵² Kerley (1965).

starosti analizom promjena u obrascima metilacije DNA potpuno je novo područje koje je okupiralo znanstvenike, a porast interesa vidljiv je i u broju istraživanja. Promjene u genomu povezane sa starenjem, ostavljaju trag i u obrascu metilacije DNA. Metoda analize metilacije DNA korisna je u forenzičkim slučajevima kada nije prisutan skeletni uzorak (ili postoji samo fregment), odnosno kada se radi o tjelesnim tekućinama. U istraživanjima su identificirani određeni geni (*ELOVL2*) koji su bili u jakoj korelaciji sa starošću. Cilj svih istraživanja je bio identificirati što više takvih lokusa na temelju kojih bi se mogla procjenjivati starost pojedinca. Unatoč velikim mogućnostima ove metode, postoje i određena ograničenja. Količina molekule DNA koja se pronalazi na mjestu zločina ili nalazištu, često je nedostatna za analizu. Osim toga, na obrasce metilacije DNA ne utječe samo starenje, već i vanjski čimbenici (prehrana, pušenje, alkohol). U istraživanjima su otkrivene i interpopulacijske razlike, a mnogo toga ovisi i o uzorcima. Važno je znati sve varijable kada se procjenjuje starost. Kod metilacije DNA i najmanji vanjski utjecaj može promijeniti obrazac i dovesti do pogrešne procjene. Znanstvenici su proveli brojna istraživanja o obrascima metilacije DNA pušača i pokazali hipometilaciju određenih regija u genomu. Razlike među biogeografski različitim populacijama također su vidljive, ali su identificirani određeni zajednički lokusi koji bi mogli otvoriti put daljnjim istraživanjima i otkrićima u određivanju starosti. Istraživanja su se uglavnom provodila na tjelesnim tekućinama, ali ukoliko se znanstvenici budu vodili primjerom Giulianija i suradnika (2015) koji su svoja znanja o metilaciji DNA primijenili na analizu dentalnih ostataka, može doći do velikog napretka u određivanju starosti pomoću analize metilacije DNA u koštanim ostacima. U analizama drevnih populacija⁵³, rezultati su pokazali da je moguće iščitati epigenetičke obrasce čak i iz povijesnih uzoraka. Što se tiče forenzičkih slučajeva, iako je većina istraživanja provedena upravo na uzorcima krvi, pokazano je da čak i stari uzorci mogu biti analizirani, uz precizne rezultate. Bez obzira na određena ograničenja određivanja starosti pomoću metilacije DNA, dosadašnja su istraživanja pokazala velik potencijal, kako u forenzičkim, tako i u arheološkim slučajevima.

Standardne, makromorfološke metode još uvijek su primarne metode određivanja doživljene starosti u arheološkom kontekstu. Razvitak tehnologija dovodi do sve preciznijih i manje destruktivnih metoda koje će u konačnici poboljšati procjene doživljene starosti. Pojedine eksperimentalne metode mogle bi u budućnosti pridonijeti makromorfološkim metodama, omogućavajući analizu na mikroskopskoj razini. Analiza metilacije DNA uvelike će doprinijeti rješavanju forenzičkih slučajeva, s obzirom da se obrasci promatraju na

⁵³ Smith i suradnici (2015)

molekularnoj razini. U arheološkim uzorcima ekstrakcija DNA je otežana, ali istraživanja su pokazala da je i to moguće. Sve metode imaju svoje nedostatke, ali je važno raditi na njihovom unapređenju, kako bi se u budućnosti mogle primjenjivati na globalnoj razini.

6. ZAKLJUČAK

U radu su prikazane standardne i eksperimentalne metode određivanja doživljene starosti. Opsežnija istraživanja i rastući broj radova o standardnim, odnosno makromorfološkim metodama određivanja doživljene starosti upućuju na porast interesa znanstvenika u spomenutom području. Iako svaka metoda ima nedostataka, ukoliko ju provodi iskusan forenzični antropolog ili bioarheolog njihova je preciznost u procjeni starosti i više nego zadovoljavajuća. U arheološkim populacijama, raspon procijenjene starosti od 5 do 15 godina neće bitno promijeniti sliku života populacije, međutim kada su u pitanju procjene starosti u forenzičkoj antropologiji, važna je preciznost. U slučajevima kao što su identifikacija nestale ili ubijene osobe ili određivanja starosti osobe nepoznatog identitea, npr. djece imigranata bez dokumenata, čak i manje pogreške u procjeni mogle bi stvoriti problem. Ukoliko se pojedinac nalazi na prijelaznoj dobi adolescent -> odrasla osoba, važno je što preciznije odrediti starost kako bi se mogli utvrditi točni sudski procesi. U identifikaciji nestalih ili ubijenih osoba, preciznost određivanja doživljene starosti uvjetuje i preciznost točne identifikacije. U radu su opisane standardne metode koje se koriste najčešće u arheološkom kontekstu, u svrhu stvaranja paleodemografskih profila povijesnih populacija. Najveći problem određivanja starosti standardnim metodama svakako su fragmentirani ostaci ljudskih kostiju te nepotpuni kosturi ili dijelovi kostura koji se rijetko pronalaze na nalazištima. Podaci o fetalnim osteološkim ostacima iznimno su rijetki na arheološkim nalazištima, stoga i izrazito vrijedni. Možemo zaključiti da uspješnost metoda ovisi o pronađenim nalazima. Vrlo je važno prikupiti što je moguće više podataka kako bi preciznost procjene bila što veća. Upravo se iz tog razloga analiziraju dijelovi koji su otporniji, odnosno češće ih se pronalazi na nalazištima, kao što je crijevna kost ili dentalni ostaci. Metode su podijeljene ovisno o tome koja dobna skupinu se istražuje, što nam ukazuje na kompleksnost pristupa. U znanstvenom miljeu, potrebno je uspoređivati metode na uzorcima poznate dobi, kako bi se sa sigurnošću mogla utvrditi pouzdanost samih metoda. Upotreba standardnih metoda u suvremenoj forenzici prvi je korak u procjeni doživljene starosti, a eksperimentalne metode njihova su dopuna. S obzirom da su mikroskopske metode te metode DNA analize često skupe i destruktivne, izbjegavaju se na arheološkim uzorcima, uzimajući u obzir ograničenost izvora. Stoga bi kombinacija makromorfoloških i histoloških metoda bila najbolja kombinacija za određivanje doživljene starosti osobe. Unatoč brojnim istraživanjima i obećavajućim rezultatima, eksperimentalne metode još su uvijek upravo to –

eksperimentalne. U kombinaciji standardnih i eksperimentalnih metoda moguć je razvitak obaju pristupa. DNA analiza novost je u području određivanja starosti te je u dosadašnjim istraživanjima pokazala obećavajuće rezultate. Međutim, trenutno je analiza provedena uglavnom na tjelesnim tekućinama i mekim tkivima kao što su krv, slina, sluznica, mozak i koštano-mišićna tkiva. Analize skeletnih ostataka još su uvijek rijetke, ali ukoliko se ovakav opseg istraživanja nastavi, postoje velike šanse za napredak, kako u biologiji i forenzičnim znanostima, tako i u forenzičnoj antropologiji.

7. LITERATURA

1. Adaikalakoteswari, A., Finer, S., Voyias, P.D., McCarthy, C.M., Vatish, M., Moore, J., Smart-Halajko, M. i sur. (2015). Vitamin B12 insufficiency induces cholesterol biosynthesis by limiting s-adenosylmethionine and modulating the methylation of SREBF1 and LDLR genes. *Clinical Epigenetics*. 27;7:14.
2. Acsádi, Gy., and Nemeskéri, J. (1970). *History of Human Life Span and Mortality*. Akadémiai Kiadó. Budimpešta.
3. Aiello, L. C., Molleson, T. (1993). Are Microscopic ageing techniques more accurate than macroscopic ageing techniques? *Journal of Archaeological Science* 20:689-704.
4. Albinus, B.S. (1737). *Icones ossiumfoetus humani*. Leidae Batavorum.
5. Amprino, R., Bairati, A. (1936). Processi di Ricostruzione e di Riassorbimento nella Sostanza Compatta delle Ossa Dell 'Uomo. Ricerche su Cento Soggetti dalla Nascita Sino a Tarda Eta. *Zeitschrift fur Zellforschung und Mikroskopische Anatomie* 24:439-511.
6. Anderson, M., Green, W. T., and Messner, M. B. (1963). Growth and predictions of growth in the lower extremities. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 45:1–14.
7. Baker, R. K. (1984). *The Relationship of Cranial Suture Closure and Age Analyzed in a Modern Multi-Racial Sample of Males and Females*. M.A. Thesis, Dept. of Anthropology, California State University, Fullerton.
8. Balthazard, V., Dervieux, H. (1921). D'études anthropologiques sur le foetus humain. *Annales de Medicine Legales* 1:37-42.
9. Barrès, R. i sur. (2012). Acute Exercise Remodels Promoter Methylationin Human Skeletal Muscle. *Cell Metabolism*. 15(3), 405-411,
10. Bedford, M. E., Russell, K. F., Lovejoy, C. O., Meindl, R. S., Simpson, S. W., Stuart-Macadam, P.L. (1993). Test of the multifactorial aging method using skeletons with known ages-at-death from the grant collection. *American Journal of Physical Anthropology* 91:287-297.
11. Berg, G. E. (2008). Pubic Bone Age Estimation in Adult Women. *Journal of Forensic Sciences* 53(3):569-577.
12. Bertino, E., Di Battista, E., Bossi, A., Pagliano, M., Fabris, C., Aicardi, G. and Milani, S. (1996). Fetal growth velocity: kinetic, clinical and biological aspects. *Archives of Disease in Childhood* 74:10-15.

13. Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes and Development* 16:6–21
14. Birkbeck, J. A. (1976). Metrical growth and skeletal development of the human fetus. U: Roberts, D. F., Thomson, A. M. (ur.). *The Biology of Human Fetal Growth*, pp. 39-68. Taylor and Francis. London.
15. Bocklandt, S., Lin, W., Sehl, M.E. i sur. (2011). Epigenetic predictor of age. *PLoS ONE*,6, e14821.
16. Boldsen, J. L., Milner, G. R., Konigsberg, L. W., Wood, J. W. (2002). Transitional analysis: a new method for estimating age from skeletons. U: Hoppa, R. D., Vaupel, J. W. (ur.). *Paleodemography: Age distributions from skeletal samples*. Cambridge University Press.
17. Brooks, S., and Suchey, J. M. (1990). Skeletal age determination based on the os pubis: A comparison of the Acsádi–Nemeskéri and Suchey–Brooks methods. *Human Evolution* 5:227–238.
18. Brothwell, D. R. (1981). *Digging up Bones*. Cornell University Press (3rd edition). Sage House, New York.
19. Cho, H., Stout, S. D., Madsen, R. W., and Streeter, M. A. (2002). Population-specific histological age-estimating method: a model for known African-American and European-American skeletal remains. *Journal of Forensic Sciences* 47:12–18.
20. Croft, M. S., Desai, G., Seed, P.T., Pollard, J. I. and Perry, M.E. (1999). Application of obstetric ultrasound to determine the most suitable parameters for the aging of formalin- fixed human fetuses using manual measurements. *Clinical Anatomy* 12: 84-93.
21. Damjanov, I., Jukić, S., Nola, M. (2011). *Patologija*. Medicinska naklada, Zagreb.
22. Demirjian, A., Goldstein, H., Tanner, J. M.(1973). A new system of dental age assessment. *Human Biology*, 45:2, p. 211
23. Demirjian, A., Goldstein, H. (1976). New systems for dental maturity based on seven and four teeth. *Annals of Human Biology*. 3(5), pp. 411-421.
24. Drusini, A. G., Toso, O., Ranzato, C. (1997). The coronal pulp cavity index: A biomarker for age determination in human adults. *American Journal of Physical Anthropology* 103:353-363

25. Dubowitz, L. M. S., Dubowitz, V. and Goldberg, C. (1970). Clinical assessment of gestational age in the newborn infant. *Journal of Pediatrics* 77: 1-10.
26. Ehrlich, M., Gama-Sosa M. A., Huang L. H., Midgett R. M., Kuo K. C., McCune R. A., Gehrke, C. (1982). Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Research* 10:2709-21.
27. Ericksen, M. F. (1976). Cortical bone loss with age in three native American populations. *American Journal of Physical Anthropology* 45:443-452
28. Ericksen, M. F. (1991). Histological estimation of age at death using the anterior cortex of the femur. *American Journal of Physical Anthropology* 84:171-179.
29. Fazekás, I. Gy., and Kósa, F. (1978). *Forensic Fetal Osteology*. Akadémiai Kiadó. Budimpešta.
30. Feng, J., Fan G. (2009). The role of DNA methylation in the central nervous system and neuropsychiatric disorders. *Int. Rev. Neurobiol.* 89:67-84.
31. Ferembach, D., Schwidetsky, I. and Stloukal, M. (1980). Recommendations for age and sex diagnoses of skeletons. Report of the Workshop of European Anthropologists (WEA). *Journal of Human Evolution* 9:517-549.
32. Flecker, H. (1942). Time of appearance and fusion of ossification centers as observed by roentgenographic methods. *The American Journal of Roentgenology and Radium Therapy* 47:97–159.
33. Foulks, J.M., Parnell, K.M., Nix, R.N. i sur.. (2012). Epigenetic Drug Discovery: Targeting DNAMethyltransferases. *Journal of Biomolecular Screening*,17 (1), 2-17.
34. Freire-Aradas, A., Phillips, C., MosqueraMiguel, A., Giron-Santamaria, L., Gomez-Tato, A., Casares de Cal, M. i sur. (2016). Development of a methylation marker set for forensic age estimation using analysis of public methylation data and the Agena Bioscience EpiTYPER system. *Forensic Science International: Genetics*, 24: 65–74.
35. Garagnani P, Bacalini MG, Pirazzini C. i sur (2012) Methylation of ELOVL2 gene as a new epigenetic marker of age. *Aging Cell* 11, 1132-1134.
36. Garn, S. M., Rohmann, C. G. and Blumenthal, T. (1966). Ossification sequence polymorphism in skeletal development. *American Journal of Physical Anthropology* 24:101-116.
37. Giuliani, C., Cilli, E., Bacalini, M. G., Pirazzini, C., Sazzini, M., Gruppioni, G., Franceschi, C., Garagnani, P., Luiselli, D. (2016). Inferring Chronological Age from

- DNA Methylation Patterns of Human Teeth. *American Journal of Physical Anthropology*, 159:585–595.
38. Grube, D., Reinbach, W. (1976). Das Cranium eines menschlichen Embryo von 80mm Sch.-St. Linge. *Anatomy and Embryology* 149:183-208.
 39. Gustafson, G. (1950). Age determinations on teeth. *Journal of the American Dental Association* 41:45-54.
 40. Haavikko, K. (1973). The physiological resorption of the roots of deciduous teeth in Helsinki children. *Proceedings of the Finnish Dental Society* 69:93-98.
 41. Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sada S, et al (2013). Genome-wide Methylation Profiles Reveal Quantitative Views of Human Aging Rates. *Mol Cell* 49:359–367.
 42. Harris, E. F., and McKee, J. H. (1990). Tooth mineralization standards for blacks and whites from the middle southern United States. *Journal of Forensic Sciences* 35:859–872.
 43. Hartnett, K. M. (2010) Analysis of age-at-death estimation using data from a new, modern autopsy sample--part I: pubic bone. *Journal of Forensic Science* 55(5): 1145-1151.
 44. Hesdorffer, M. B. and Scammon, R. E. (1928). Growth of long-bones of human fetus as illustrated by the tibia. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 25:638-641.
 45. Hilson, S. (1986). *Teeth*. Cambridge University Press. England.
 46. Hoffman, J. M. (1979). Age estimations from diaphyseal lengths: two months to twelve years. *Journal of Forensic Sciences* 24:461–469.
 47. Hofreiter, M., Jaenicke, V., Serre, D., Haeseler, A von., Pääbo, S. (2001). DNA sequences from multiple amplifications reveal artifacts induced by cytosine deamination in ancient DNA. *Nucleic Acids Research*, 29:4793.
 48. Horvath, S. (2013). DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome Biology* 14:31-56.
 49. Huang, Y., Yan, J., Hou, J., Fu, X., Li, L., Hou, Y. (2015). Developing a DNA methylation assay for human age prediction in blood and bloodstain. *Forensic Science International: Genetics*, 17:129.
 50. Humphrey, L. T. (1998). Growth patterns in the modern human skeleton. *American Journal of Physical Anthropology* 105:57-72.

51. Irizarry R. A., Ladd-Acosta, C., Wen, B., Wu, Z., Montano, C., Onyango, P., Cui, H., Gabo, K., Rongione, M., Webster, M., Ji, H., Potash, J. B., Sabunciyan, S., Feinberg, A. P. (2009). The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nature Genetics* 41:178-186.
52. Işcan, M. Y., Loth, S. R., and Wright, R. K. (1984). Age estimation from the rib by phase analysis: white males. *Journal of Forensic Sciences* 29:1094–1104.
53. Işcan, M. Y., Loth, S. R., and Wright, R. K. (1985). Age estimation from the rib by phase analysis: white females. *Journal of Forensic Sciences* 30:853–863.
54. Işcan, M. Y., and Loth, S. R. (1986). Estimation of age and determination of sex from the sternal rib. U: K. J. Reichs (ur.), *Forensic Osteology: Advances in the Identification of Human Remains*, pp. 68–89. Charles C. Thomas, Springfield, IL.
55. Işcan, M. Y., Loth, S. R., and Wright, R. K. (1987). Racial variation in the sternal extremity of the rib and its effect on age determination. *Journal of Forensic Sciences* 32:452–466.
56. Işcan, M. Y., Loth, S. R., Wright, R. K. (1993). *Casts of age phases from the sternal end of the rib for white males and females*. France Casting. Bellevue, CO.
57. Jones, P. A., Liang, G. (2009). Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nature Reviews Genetics* 10:805-11.
58. Jones, M.J., Goodman, S.J., Kobor, M.S. (2015). DNA methylation and healthy human aging. *Aging Cell*, 14, 924-932.
59. Jowsey, J. (1960). Age changes in human bone. *Clinical Orthopaedics* 17:210-217.
60. Junqueira, L. C., Carneiro, J. (2005). *Osnove histologije – udžbenik i atlas (prema 10. američkom izdanju)*. Školska knjiga, Zagreb.
61. Kemkes-Grottenhaler, A. (2002). Aging through the ages: historical perspectives on age indicator methods. U: Hoppa, R. D., Vaupel, J. W. (ur.). *Paleodemography: Age distributions from skeletal samples*. Cambridge University Press.
62. Kerckring, T. (1670). *Spicilegium anatomicum, continens observationum anatomicarum rariorum centuriam unam: nec non osteogeniam foetuum*. Sumptibus Andreae Frisii.
63. Kerckring, T. (1717). *Spicilegium Anatomicum Osteogeniam Foetuum*. Leiden.
64. Kerley, E. R. (1965). The microscopic determination of age in human bones. *American Journal of Physical Anthropology* 23:149–163.

65. Kerley, E. R., and Ubelaker, D. H. (1978). Revisions in the microscopic method of estimating age at death in human cortical bone. *American Journal of Physical Anthropology* 49:545–546.
66. Key, C. A., Aiello, L. C., and Molleson, T. (1994). Cranial suture closure and its implications for age estimation. *International Journal of Osteoarchaeology* 4:193–207.
67. Kim, S., Welsh, D. A., Cherry, K. E., Myers, L., Jazwinski, S. M. (2013). *Association of healthy aging with parental longevity*. *Age* 35:1975–1982.
68. Kim, S., Myers, L., Wyckoff, J., Cherry, K. E., Jazwinski, S. M. (2017). The frailty index outperforms DNA methylation age and its derivatives as an indicator of biological age. *GeroScience* 39:83-92.
69. Klepinger, L. L. (2001). Stature, maturation variation and secular trends in forensic anthropology. *Journal of Forensic Sciences* 46: 788–790.
70. Klepinger, J. (2006). *Fundamentals of forensic anthropology*. A John Wiley & Sons, Inc., Publication. Illinois.
71. Krogman, W. M. (1962). *The Human Skeleton in Forensic Medicine*. Charles C. Thomas. Springfield.
72. Kvaal, S. I., Sellevold, B. J., Solheim, T. (1994). A comparison of different non-destructive methods of age estimation in skeletal material. *International Journal of Osteoarchaeology* 4:363-370.
73. Lamendin, H., Baccino, E., Humbert, J. F., Tavernier, J. C., Nossintchouk, R. M., Zerilli, A. (1992). A simple technique for age estimation in adult corpses: The two criteria dental method. *Journal of Forensic Sciences*. 37:1373-1379.
74. Lee, H.Y., Jung, S.E., Oh, Y.N., Choi, A., Yang, W.I., Shin, K.J. (2015). Epigenetic age signatures in the forensically relevant body fluid of semen: a preliminary study. *Forensic Science International: Genetics*, 19, 28-34.
75. Lee, H.Y., Lee, S. D., Shin, K. J. (2016). Forensic DNA methylation profiling from evidence material for investigative leads. *BMB Reports*, 49(7): 359-369.
76. Lewis, A. B. and Garn, S. M. (1960). The relationship between tooth formation and other maturational factors. *Angle Orthodontist* 30:70-77.
77. Lister R, Ecker J. R. (2009) Finding the fifth base: genome-wide sequencing of cytosine methylation. *Genome Research* 19:959-66.

78. Lovejoy, C. O., Meindl, R. S., Mensforth, R. P., and Barton, T. J. (1985a). Multifactorial determination of skeletal age at death: a method and blind tests of its accuracy. *American Journal of Physical Anthropology* 68:1–14.
79. Lovejoy, C. O., Meindl, R. S., Pryzbeck, T. R., and Mensforth, R. P. (1985b). Chronological metamorphosis of the auricular surface of the ilium: a new method for the determination of adult skeletal age at death. *American Journal of Physical Anthropology* 68:15–28.
80. Lovejoy, C. O. i suradnici (1985c). Eight papers on Todd and Libben skeletal material. *American Journal of Physical Anthropology* 68:1-106
81. Lovejoy, C. O. (1985d). Dental wear in the Libben population: Its functional pattern and role in the determination of adult skeletal age at death. *American Journal of Physical Anthropology* 68:47-56.
82. Macchiarelli, R., Bondioli, L. (1994). Linear densitometry and digital image processing of proximal femur radiographs: Implications for archaeological and forensic anthropology. *American Journal of Physical Anthropology* 93:109-122.
83. Mann, R. W., Symes, S. A., Bass, W. M. (1987). Maxillary Suture Obliteration: Aging the Human Skeleton Based on Intact or Fragmentary Maxilla. *Journal of Forensic Sciences*, 32:148-157.
84. Maples, W. R., and Rice, P. M. (1979). Some difficulties in the Gustafson dental age estimations. *Journal of Forensic Sciences* 24:168–172.
85. Maresh, M. M. (1943). Growth of major long bones in healthy children. *American Journal of Diseases of Children* 66:227-257.
86. Maresh, M. M. (1955). Linear growth of long bones of extremities from infancy to adolescence. *American Journal of Diseases of Children* 89: 725–742.
87. Martin, R. (1957). *Lehrbuch der Anthropologie in Systematischer Darstellung*. Treće izdanje. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart.
88. Mays, S. (2002). The relationship between molar wear and age in an early 19th century AD archaeological human skeletal series of documented age at death. *Journal of Archaeological Science* 29:861-871.
89. McKee, J. K., Molnar, S. (1988). Measurements of tooth wear among Australian Aborigines. II. Intrapopulational variation in patterns of dental attrition. *American Journal of Physical Anthropology*. 76:125-136.

90. McKern, T. W. and Stewart, T. D. (1957). *Skeletal age changes in young American males, analysed from the standpoint of age identification*. Headquarters Quartermaster Research and Development Command, Technical Report EP-45. Natick, MA.
91. Meindl, R. S., and Lovejoy, C. O. (1985). Ectocranial suture closure: a revised method for the determination of skeletal age at death based on the lateral– anterior sutures. *American Journal of Physical Anthropology* 68:57–66.
92. Meindl, R. S., and Lovejoy, C. O. (1989). Age changes in the pelvis: implications for paleodemography. U: Işcan, M. Y. (ur.), *Age Markers in the Human Skeleton*. Charles C. Thomas. Springfield, IL.
93. Meindl, R. S., Russell, K. F. (1998). Recent Advances in Method and Theory in Paleodemography. *Annual Review of Anthropology* 27:375-399.
94. Meyer, D. B., O'Rahilly, R. (1958). Multiple techniques in the study of the onset of prenatal ossification. *Anatomical Record* 132:181-193.
95. Miles, A.E.W. (1963). Dentition in the estimation of age. *Journal of Dental Research* 42:255-263.
96. Miles, A. E. W. (2001). The Miles method of assessing age from tooth wear revisited. *Journal of Archaeological Science* 28:973-982.
97. Milner, G. R., Larsen, C. S. (1991). Teeth as artifacts of human behavior: Intentional modification and accidental modification. U: M. A. Kelley and C. S. Larsen (ur.) *Advances in Dental Anthropology*, pp.357-378. Wiley-Liss. New York.
98. Milner G. R., Boldsen J. L. (2012). Transition analysis: a validation study with known-age modern American skeletons. *American Journal of Physical Anthropology* 148(1):98-110.
99. Molleson, T. and Cox, M. (1993). The Spitalfields Project. *The Anthropology - The Middling Sort, Research Report* 86. Council for British Archaeology. London.
100. Monteiro, J. i sur. (2014). Methylation potential associated with diet, genotype, protein, and metabolite levels in the Delta Obesity Vitamin Study. *Genes and Nutrition* 9(3): 403.
101. Moorrees, C., Fanning, E., and Hunt, E. (1963). Age variation of formation stages for ten permanent teeth. *Dental Research* 42(6):1490–1502.
102. Murray, K. A., and Murray, T. (1991). A test of the auricular surface aging technique. *Journal of Forensic Sciences* 36: 1162–1169.

103. Nawrocki, S. P. (1998). Regression formulae for estimating age at death from cranial suture closure. U: Reichs, K. J. (ur.), *Forensic Osteology: Advances in Identification of Human Remains*, pp. 276–29. Charles C. Thomas, Springfield, IL.
104. Noback, C. R. (1943). Some gross structural and quantitative aspects of the developmental anatomy of the human embryonic, fetal and circumnataal skeleton. *Anatomical Record* 87: 29-51.
105. Noback, C.R. (1944). The developmental anatomy of the human osseous skeleton during the embryonic, fetal and circumnataal periods. *Anatomical Record* 88:91-125.
106. Noback, C. R. and Robertson, G. G. (1951). Sequences of appearance of ossification centres in the human skeleton during the first five prenatal months. *American Journal of Anatomy* 89: 1-28.
107. Norimatsu, H., Mori, S., Uesato, T., Yoshikawa, T., Katsuyama, N. (1989). Bone mineral density of the spine and proximal femur in normal and osteoporotic subjects in Japan. *Bone and mineral*, 5(2), pp. 213-222.
108. Ogino, T., Ogino, H., Nagy, B. (1985). Application of Aspartic acid racemization to forensic odontology: Post mortem designation of age at death. *Forensic Science International* 29:259-267.
109. O'Rahilly, R. (1997). "Gestational Age". *Clinical Anatomy* 10(5):367.
110. O'Rahilly, R., Gardner, E. (1972). The initial appearance of ossification in staged human embryos. *American Journal of Anatomy* 134: 291-301.
111. Ortner, D. J. (2003). *Identification of pathological conditions in human skeletal remains*. Elsevier Academic Press.
112. Osbourne, D. L., Simmons, T. L., and Nawrocki, S. P. (2004). Reconsidering the auricular surface as an indicator of age at death. *Journal of Forensic Sciences* 49:905–911.
113. Paine, R.R., Brenton, B. P. (2006). Dietary Health Does Affect Histological Age Assessment: An Evaluation of the Stout and Paine (1992) Age Estimation Equation Using Secondary Osteons from the Rib. *Journal of Forensic Science*. 51(3):489-492.
114. Park, J.L., Kim, J.H., Seo, E., Bae, D.H., Kim, S.Y., Lee, H.C., Woo, K.M., Kim, Y.S. (2016). Identification and evaluation of age-correlated DNA methylation markers for forensic use. *Forensic Sciences International: Genetics*, 23:64-70.

115. Parson, W. (2018). Age Estimation with DNA: From Forensic DNA Fingerprinting to Forensic (Epi)Genomics: A Mini-Review. *Gerontology*, 64(4):326-332.
116. Pavlica, M. <http://www.genetika.biol.pmf.unizg.hr/pogl17.html>, dostupno 11. prosinca 2017. godine
117. Pedersen, J.S., Valen, E., Velazquez, A.M.V., Parker, B.J., Rasmussen, M., Lindgreen, S., Lilje, B. i sur. (2014). Genome-wide nucleosome map and cytosine methylation levels of an ancient human genome. *Genome Research*. 24:454.
118. Potočki, K. (2005). Osteoarthritis - radiološke mogućnosti prikaza. *Reumatizam*. Vol. 52, No. 2.
119. Prince, D. A., and Ubelaker, D. H. (2002). Application of Lamendin's adult dental aging technique to a diverse skeletal sample. *Journal of Forensic Sciences* 47:107–116.
120. Rambaud, A., Renault, Ch. (1864). *Origine et Development des Os*. Librairie de E Chamerot. Pariz.
121. Riggs, B.L., Wahner, H.W., Seeman, E., Offord, K.P., Dunn, W.L., Mazess, R.B., Johnson, K.A., Melton, L.J. (1982). *The Journal of Clinical Investigation*, 70(4), pp. 716-723.
122. Roberts, D.F. (1976). Environment and the fetus. U: Roberts, D. F., Thomson, A. M. (ur.). *The Biology of Human Fetal Growth*, pp. 267-283. Taylor and Francis. London.
123. Robling, A.G., Stout, S. D. (2008). Histomorphometry of Human Cortical Bone: Applications to Age Estimation. U: Kaztenber, M.A., Saunders, S. R. (ur.) *Biological Anthropology of the Human Skeleton*. pp. 149-182. John Wiley & Sons, Inc.
124. Roche, A. E. (1986). Bone growth and maturation. U: Falkner, F., Tanner, J. M. (ur.), *Human Growth, A Comprehensive Treatise*, pp. 25-60. Plenum Press. New York.
125. Mantila Roosa, S. M., Hurd, A. L., Xu, H., Fuchs, R. K., Warden, S. J. (2012). Age-related changes in proximal humerus bone health in healthy, white males. *Osteoporosis International*. Vol. 23, pp. 2775-2783.
126. Sarajlić, N., Gradašćević, A. (2012). Morphological characteristics of pubic symphysis for age estimation of exhumed persons. *Bosnian Journal of Basic Medical Science*. 12(1): 51-54.

127. Schaefer M., Black, S., Scheuer, L. (2009). *Juvenile Osteology: A Laboratory and Field Manual*. Elsevier Academic Press.
128. Scheuer, J. L., Musgrave, J. H. and Evans, S. P. (1980). The estimation of late fetal and perinatal age from limb bone length by linear and logarithmic regression. *Annals of Human Biology* 7:257-265.
129. Scheuer, J. L., Black, S. (2000) *Developmental Juvenile Osteology*. Elsevier Academic Press.
130. Schmitt, A. (2004). Age-at-death assessment using the os pubis and auricular surface of the ilium: a test on an identified Asian sample. *International Journal of Osteoarchaeology* 14:1–6.
131. Smith, S. L. (2004). Skeletal age, dental age, and the maturation of KMN-WT 15000. *American Journal of Physical Anthropology* 125:105–120.
132. Smith, R.W.A., Monroe, C., Bolnick, D.A. (2015). Detection of Cytosine Methylation in Ancient DNA from Five Native American Populations Using Bisulfite Sequencing. *PLoS ONE*. 10(5):e0125344.
133. Steele, D. G., Bramblett, C. A. (1988). *The anatomy and biology of the human skeleton*. Texas A&M University Press, College Station, Texas.
134. Stout, S. D. (1986). The use of bone histomorphology in skeletal identification: the case of Francisco Pizarro. *Journal of Forensic Sciences* 31:296–300.
135. Stout, S. D. (1989). The use of cortical bone histology to estimate age at death. U: Işcan M. Y. (ur.), *Age Markers in the Human Skeleton*, pp. 195–207. Charles C. Thomas, Springfield, IL.
136. Stout, S.D. (1998). The application of histological techniques for age at death determination. U: Reichs, K. J. (ur.) *Forensic Osteology*, pp. 237-252. CC Thomas, Springfield.
137. Streeter, G. L. (1920). Weight, sitting height, head size, foot length and menstrual age of the human embryo. *Contributions to Embryology* 11:143-170.
138. Streeter, G.L. (1942). Developmental horizons in human embryos. Description of age group XI 13 to 20 somites and age group XII 21 to 29 somites. *Contributions to Embryology* 30: 211-245.

139. Takata, S., Yasui, N. (2001). Disuse osteoporosis. *The Journal of Medical Investigation*. Vol. 48, pp. 147-156.
140. Tanner, J. M. (1962). *Growth at Adolescence*. Blackwell Scientific. Oxford.
141. Tanner, J.M. (1978). *Foetus into Man - Physical Growth from Conception to Maturity*. Open Books. London.
142. Tanner, J. M., Whitehouse, R. H., Marshall, W. A., Healy, M. J. R., and Goldstein, H. (1975). *Assessment of skeletal Maturity and Prediction of Adult Height (TW2 Method)*. New York: Academic Press.
143. Thomson, D. D., Guinness-Hey, M. (1981). Bone mineral-osteon analysis of Yupik-Inupiaq skeletons. *American Journal of Physical Anthropology* 55:1-7
144. Todd, T. W. (1920). Age changes in the pubic bone. The male white pubis. *American Journal of Physical Anthropology* 3:285-334.
145. Todd, T. W., and Lyon, D.W. (1924). Endocranial suture closure: its progress and age relationship. Part I. Adult males of white stock. *American Journal of Physical Anthropology* 7:326–384.
146. Todd, T. W., and Lyon, D. W. (1925a). Cranial suture closure: its progress and age relationship. Part II. Ectocranial Closure in Adult males of white stock. *American Journal of Physical Anthropology* 8:23–45.
147. Todd, T. W., and Lyon, D. W. (1925b). Cranial suture closure: its progress and age relationship. Part III. Endocranial Closure in Adult males of negro stock. *American Journal of Physical Anthropology* 8:47–71.
148. Todd, T. W., and Lyon, D. W. (1925c). Cranial suture closure: its progress and age relationship. Part IV. Ectocranial Closure in Adult males of negro stock. *American Journal of Physical Anthropology* 8: 149–168.
149. Tucker, J.A. and O'Rahilly, R. (1972). Observations on the embryology of the human larynx. *Annals of Otology, Rhinology and Laryngology* 81: 520-523.
150. Ubelaker, D. H. (1989). *Human Skeletal Remains: Excavation, Analysis, Interpretation*. DC: Taraxacum. Washington.
151. Vidaki, A., Daniel B., Syndercombe Court, D. (2013). Forensic DNA methylation profiling – Potential opportunities and challenges. *Forensic Science International: Genetics*. 7(5):499-507.

152. Walker, R. A., Lovejoy, C. O. (1985). Radiographic changes in the clavicle and proximal femur and their use in the determination of skeletal age at death. *American Journal of Physical Anthropology* 68:67-78.
153. Walker, P. L., Dean, G., Shapiro, P. (1991). Estimating age from tooth wear in archaeological populations. U: Kelley, M. A., Larsen, C. S. (ur.) *Advances in Dental Anthropology*, pp. 169-178. New York: Wiley-Liss.
154. Warren, M. W. (1999). Radiographic determination of developmental age in fetuses and stillborns. *Journal of Forensic Sciences* 44(4): 708–712.
155. Webb, P. A. O., and Suchey, J. M. (1985). Epiphyseal union of the anterior iliac crest and medial clavicle in a modern multiracial sample of American males and females. *American Journal of Physical Anthropology* 68:457–466.
156. Weidner, C.I., Lin, Q., Koch, C.M. i sur. (2014). Aging of blood can be tracked by DNA methylation changes at just three CpG sites. *Genome Biology*, 15, R24.
157. White, T. D. (2000). *Human Osteology*. Academic Press.
158. White, T. D., Folkens, P. A. (2005). *The Human Bone Manual*. Elsevier Academic Press.
159. Whittaker, D. (2000). Ageing from the dentition. U: Cox, M., Mays, A. (ur.) *Human Osteology in Archaeology and Forensic Science*, pp. 83-99. Greenwich Medical Media, Ltd. London.
160. Willems, G., Van Olmen, A., Spiessens, B., Carels, C. (2001). Dental Age Estimation in Belgian Children: Demirjian's Technique Revisited. *Journal of Forensic Sciences*.46(4):893-895.
161. Wilson, A.S., Power, B.E., Molloy P.L. (2007). DNA hypomethylation and human diseases. *Biochem. Biophys. Acta* 1775:138-162.
162. Wood, N. K., Wragg, L. E., Stuteville, O. H. and Oglesby, R.J. (1969). Osteogenesis of the human upper jaw: proof of the non-existence of a separate pre-maxillary centre. *Archives of Oral Biology* 14:1331-1341.
163. Xu, C., Qu, H., Wang, G., Xie, B., Shi, Y., Yang, Y., Zhao, Z., Hu, L., Fang, X., Yan, J. i sur. (2015). A novel strategy for forensic age prediction by DNA methylation and support vector regression model; *Scientific Reports*, 5:17788.
164. Youssef, E. H. (1964). The development of the human skull in a 34 mm human embryo. *Acta Anatomica* 57:72-90.

165. Zawisch, C. (1956). Missverhältniss zwischen den am auf gehellten Ganzembryo und den aus histologisch-embryologischen Schnittserien gewonnenen Ossifikationsdaten. *Anatomischer Anzeiger* 102:305-316.
166. Zbieć-Piekarska, R., Spólnicka, M., Kupiec, T., Makowska, Z., Spas, A., Parys-Proszek, A., Kucharczyk, K., Płoski, R., Branicki, W. (2015). Examination of DNA methylation status of the ELOVL2 marker may be useful for human age prediction in forensic science; *Forensic Science International: Genetics*, 14:161.